

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**RECOPILACION Y REVISION DE METODOS MINIATURIZADOS  
PARA MICROBIOLOGIA**

**ELIZABETH MELGAR SIERRA**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**1980**

M-21711



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN

EL TEMA.

PRESIDENTE	Prof.	OSCAR AMOR DODERO
V O C A L	Prof.	LEONOR MARTINEZ SOTO
SECRETARIO	Prof.	OLGA VELAZQUEZ MADRAZO
1er. SUPLENTE	Prof.	LILIA VIERNA DE GARCIA
2o. SUPLENTE	Prof.	MARTHA JIMENEZ CASTAÑEDA



Sitio donde se desarrolló el tema:

Biblioteca de la Facultad de Química,  
y otras Bibliotecas de la U. N. A. M.

Elizabeth Melgar Sierra.

SUSTENTANTE

Q.F.B. Olga Velázquez Madrazo  
ASESOR DEL TEMA

A mis padres

Daniel

y

Judith

A mi abuelita

Luchi

A la memoria  
de mi abuelito

Rafa

A mis abuelitos

David y Mimina

A mis hermanas,  
maestros y  
amigos.

A TODOS ELLOS, POR SU APOYO INCONDICIONAL  
MI MAS SINCERA Y PROFUNDA GRATITUD.

Quiero expresar mi especial agradecimiento  
a la maestra:

Q.F.B. Olga Velázquez Madrazo  
por su valiosa ayuda en el asesoramiento  
de este trabajo.

"Todos navegamos  
en el mismo barco,  
en un mar tormento  
so, y nos debemos  
una terrible leal-  
tad mutua".

G.K. Chesterton

# I N D I C E

## CAPITULO I

<u>I N T R O D U C C I O N</u>	1
--------------------------------	---

## CAPITULO II

<u>M E T O D O S M I N I A T U R I Z A D O S</u>	3
--	---

1. <u>METODOS DE TUBOS PEQUEÑOS</u>	4
1.1 INDOL	5
1.2 VOGES PROSKAUER	7
1.3 CITRATO	7
1.4 FERMENTACIONES DE CARBOHIDRATOS	8
2. <u>METODOS DE TUBO CAPILAR</u>	10
2.1 <u>PARA EL AISLAMIENTO DE CELULAS INDIVIDUALES</u>	10
2.2 PARA ESTUDIAR LA MICROFLORA DEL AGUA Y DEL SUELO	11
2.3 PARA ESTUDIAR QUIMIOTACTISMO	11
2.4 PARA PRUEBAS DE FERMENTACION	11
2.4.1 Método de Morris y Kirsop	11
2.4.2 Método de Tröger	12
2.5 PARA ESTUDIAR LOS EFECTOS DE OXIGENO EN BACTERIAS	12
3. <u>METODOS DE GOTA PENDIENTE</u>	14
3.1 GOTA PENDIENTE SIMPLE	14
3.1.1 Método de Barber	15
3.1.2 Método de Blank	15
3.1.3 Método de Lindner	16

3.2	GOTA PENDIENTE CON BAÑO DE ACEITE	17
3.2.1	Método de Webley y Farmer	18
3.2.2	Método de Lederberg	18
3.2.3	Método de Michael	19
3.2.4	Método de Nossal	19
4.	<u>METODOS DE BLOQUE PENDIENTE, EN SANDWICH Y SIMILARES.</u>	22
4.1	PARA MICROCULTIVO DE HONGOS	22
4.1.1	Método de Duncan	22
4.1.2	Método de Henrici	23
4.1.3	Método de Hejtmánková-Uhrová	24
4.1.4	Método de Cooper	24
4.2	PARA MICROCULTIVO DE BACTERIAS	25
4.2.1	Método de Hill	25
4.2.2	Método de Graham-Smith	29
4.2.3	Método de Hewlett	29
4.2.4	Método de Welch	30
4.2.5	Método de Hoffman y Frank	30
4.2.6	Método de Orskov	32
4.2.7	Método de Knaysi	32
4.2.8	Método de Hort	32
4.2.9	Método de Fleming	33
4.3	OTRAS VARIANTES	34
4.3.1	Método de Klienberger y Smiles	34
4.3.2	Método de Hewitt	35
5.	<u>METODOS DE IMPRONTA</u>	36
5.1	<u>METODOS DE CULTIVO, DE ADHESION</u>	36
5.1.1	Método de Lindner	36
5.1.2	Método de Fleming	36
5.1.3	Método de Dobell	37
5.1.4	Método de Dubey y Das	37
5.2	<u>PORTAOBJETOS ENTERRADO O TECNICAS DE INMERSION</u>	38
5.2.1	Método de Casida	38
5.2.2	Método de Cholodny	39
5.2.3	Método de Kriuchkova	39
5.2.4	Método de Thornton	40
5.2.5	Método de La Touche	40
5.2.6	Método de Sewell	41
5.2.7	Método de Dobbs y Hinson	41
5.2.8	Método de Causey	42



5.3.	PRUEBAS DE GERMINACION DE ESPORAS	42
5.3.1	Método de Reddick y Wallace	42
5.3.2	Método de Horsfall	43
5.4	COLECCION DE ESPECIMENES CON CINTA DE CELOFAN	43
5.4.1	Método de Edwards	43
6.	<u>METODOS DE CAMARAS DE PERFUSION</u>	45
6.1	<u>CAMARAS QUE PERMITEN EL CAMBIO INTERMITENTE DE MEDIO</u>	46
6.1.1	Cámara de Mackaness	46
6.1.2	Cámara de Harris	48
6.1.3	Cámara de Pulvertaft	49
6.2	<u>CAMARAS DISEÑADAS PARA UNA PERFUSION CONTINUA</u>	50
6.2.1	Cámara de Pomerat	50
6.2.2	Cámara de Rose	52
6.2.3	Cámara de Sykes y Moore	53
6.2.4	Cámara de Barski y Robineaux	54
6.2.5	Cámara de Toy y Bardawil	54
6.2.6	Cámara de Christiansen	57
6.2.7	Cámara de Schwöbel	59
6.2.8	Cámara de Ware y Loveless	61
6.2.9	Cámara de Thomas y Cramer	63
6.2.10	Cámara de Carter	64
6.3	<u>CAMARAS CON SOPORTE DE MEMBRANA CELULAR</u>	65
6.3.1	Cámara de Hartman	65
6.3.2	Cámara de Vischer	66
6.3.3	Cámara de Powell	69
	a) Colocación de la cámara	72
	b) Para montar la membrana	73
	c) Para estirar la membrana	74
6.3.4	Cámara de Duxbury	75
	a) Construcción de la cámara	76
	b) Operación de la cámara	79
	b.1 Preparación de las membranas celofán	79
	b.2 Para estirar la membrana y sellar la cámara	79
	b.3 Abastecimiento de medio	81
	b.4 Control de la temperatura	83

	b.5 Inoculación	84
	b.6 Observación	84
7.	<u>METODOS DE PLACAS PEQUEÑAS EN PORTAOBJETOS</u>	86
	7.1 <u>PARA CONTEO Y LOCALIZACION DE MICROORGANISMOS VIABLES</u>	86
	7.1.1 Método de Frost	86
	7.1.2 Método de Estabrooks y Bollen	87
	7.1.3 Método de Van Oijen	87
	7.1.4 Método de Rowell	87
	7.1.5 Método de Malecki	88
	7.1.6 Método de Postgate y Cook	89
	7.1.7 Método de Taubeneck	90
	7.1.8 Método de Hort	90
	7.2 <u>PARA DETERMINAR LAS PROPIEDADES FISIOLOGICAS DE MICROORGANISMOS</u>	91
	7.3 <u>OTRA TECNICA DE CULTIVO EN PORTAOBJETOS</u>	92
	7.3.1 Método de Hort	92
8.	<u>METODOS DE CULTIVO SOBRE MATERIALES INERTES DIFERENTES AL VIDRIO</u>	94
	8.1 <u>CULTIVO SOBRE CELOFAN Y OTRAS MEMBRANAS</u>	94
	8.1.1 Método de Fleming y Smith	94
	8.1.2 Método de Hillier	95
	8.1.3 Método de van Iterson y Ruys	95
	8.2 <u>FILTROS DE MEMBRANA</u>	95
	8.2.1 Método de Funder y Johannessen	96
	8.3 <u>ENTIERRO EN EL SUELO</u>	96
	8.3.1 Método de Cholodny	96
	8.3.2 Método de Kuzniar	97
	8.3.3 Método de Tribe	97
	8.4 <u>CULTIVO EN SACOS DE DIALISIS Y BOLSAS DE PLASTICO</u>	97
	8.4.1 Método de Freter	98
	8.4.2 Método de Kneteman	98
9.	<u>METODOS DE CAJAS PETRI</u>	99
	9.1 <u>METODO DE HILLER</u>	100
10.	<u>METODOS DE DIFUSION EN AGAR</u>	103

10.1	PRUEBAS CON ANTIBIOTICOS Y OTROS COMPUESTOS INHIBIDORES	105
10.1.1	Método de McDaniels	105
10.1.2	Método de Scherr	106
10.2	PRUEBAS PARA TOXINAS MICROBIANAS	106
10.2.1	Método de Petri y Steabben	107
10.2.2	Método de Elek	107
10.3	PRUEBAS PARA ENZIMAS	108
10.3.1	Métodos para amilasas	108
10.3.1.1	Método de Wijsman	108
10.3.1.2	Método de Cook	109
10.3.1.3	Método de Iyer y Karthiayani	109
10.3.2	Métodos para proteasas	110
10.3.2.1	Método de Frazier	110
10.3.2.2	Método de Lewis	110
10.3.3	Métodos para esterases	110
10.3.3.1	Método de Rath	110
10.3.4	Métodos para penicilinasas	111
10.3.4.1	Método de Manson	111
10.4	PRUEBAS DE FERMENTACIONES DE CARBO- HIDRATOS	112
10.4.1	Método de Clarke y Steel	112
10.4.2	Método de Spaur y Wynne	113
10.5	MÉTODOS PARA VITAMINAS, AMINOACIDOS Y FACTORES DE CRECIMIENTO	113
10.5.1	Método de Taubeneck	113
11.	<u>MÉTODOS DE TIRAS DE PAPEL Y DISCOS</u>	115
11.1	<u>DETECCIÓN DE ENZIMAS</u>	116
11.1.1	Método de Sastri y Sreeniva- saya	116
11.1.2	Método de Lissitzky	116
11.2	DETERMINACIONES PARA SENSIBILIDAD AL ANTIBIOTICO	117
11.2.1	Método de Ryan	117
11.2.2	Método de Bieringer	118
11.3	TIRAS DE PAPEL COMO TRANSPORTE	119
11.3.1	Método de Hollinger	119
11.4	OTROS MÉTODOS	120
11.4.1	Método de Boyer	120
11.4.2	Método de la Warner-Lambert Company	123
11.4.3	Método con Pathotec "Rapid I- D System	126

12.	<u>METODOS DE SUBSTRATO EN PELICULA</u>	130
	12.1 Método de Gates	130
	12.2 Método de Davies	130
	12.3 Método de Bond	131
	12.4 Adaptación del método de Daoust	131
13.	<u>METODO DEL ASA CALIENTE</u>	133
14.	<u>METODOS DE PLACA DIVIDIDA</u>	136
	14.1 Método de Churchman	136
	14.2 Método de Anderson	136
	14.3 Método de van der Heyde	136
	14.4 METODOS DE PLACA DE GOTITA	137
	14.4.1 Método de Bronfenbrenner y Schlesinger	137
	14.4.2 Método de Lindner	137
	14.4.3 Método de Sharpe, Pettipher y Lloyd	138
	14.5 METODOS DE GOTA EN PLACA	145
	14.5.1 Método de Miles	145
	14.5.2 Método de Hedberg	145
15.	<u>METODOS DE LINEA DE BURRI Y TUBOS OVALES</u>	147
	15.1 Método de línea de Burri	147
	15.2 METODOS DE TUBOS OVALES	184
	15.2.1 Método de Myers y Pence	184
	15.2.2 Método de Moldavan	149
16.	<u>METODOS DE PLACA DE CONTACTO</u>	150
	16.1 Método de Angelotti y Foter	150
	16.2 Método de Angelotti	151
	16.3 Método de Litsky	151
	16.4 Método de Förg	152
	16.5 Método de Seidel y Plaschke	152
17.	<u>METODOS DE TUBO Y FRASCO GIRATORIOS</u>	154
	17.1 Método de Esmarch	154
	17.2 Método de Gee y Thompson	154
	17.3 Método de Mundinger y Woeckel	155
	17.4 Método de Tai	155

18.	<u>METODOS DE GRADIENTE</u>	157
18.1	Método de Szybalski	157
18.2	Método de Link	159
18.3	Método de Sacks	160
18.4	Método de Zack	161
18.5	Método de Battley y Bartlett	161
18.6	Método de Halldal	161
18.7	Método de Link	161
18.8	Método de Herrmann	162
19.	<u>METODOS DE DETECCION DE REACCIONES TEM- PRANAS MEDIANTE ISOTOPOS RADIOACTIVOS</u>	164
19.1	Método de Levin	164
19.2	Método de MacLeod	165
20.	<u>METODOS DE CULTIVO "IN VIVO"</u>	166
20.1	Método de Metchnikoff	166
20.2	Método de Tsuji	166
20.3	Método de Fina	167
20.4	Método de El-Shazly	167
21.	<u>METODOS DE INOCULACION MULTIPLE</u>	
21.1	<u>METODOS DE REPLICA EN PLACA Y METO- DOS RELACIONADOS</u>	169
21.1.1	Método de Lederberg y Leder- berg	170
21.1.2	Método de Parry	170
21.1.3	Método de Harris	171
21.1.4	Método de Anagnostopoulos y Woodbine	172
21.1.5	Método de Neal	172
21.1.6	Método de Watt	173
21.1.7	Método de Holliday	174
21.1.8	Método de Massey y Mattoni	175
21.1.9	Método de Haque y Baldwin	175
21.1.10	Método de Mandell	176
21.1.11	Otros aparatos de inoculación con alfileres	177
21.1.12	Método de Stewart y Widanapa- tirana	177
21.1.13	Método de Kaneko y Franklin	182
21.1.14	Método de Børge Lindström	184
21.2	<u>METODOS DE DILUCION CON ASA, PIPETAS GOTERAS Y OTRAS COSAS PARA TRANSFEREN- CIA DE CULTIVOS</u>	189
		197

21.2.1	Método de Berridge	197
21.2.2	Método de Takátsy	198
21.2.3	Método de Cook y Yousef	198
21.2.4	Método de McGuire	199
21.3	METODOS DE TUBOS Y BANDEJAS	200
21.3.1	Método de Goodfellow y Gray	200
21.3.2	Método de Koch y Kaplan	200
21.3.3	Método de Quadling y Colwell	201
21.3.4	Método de Beargie	201
21.3.5	Método de Guinée y Hansen	204
21.3.6	Método de McComb y Puzniak	208
21.3.7	Método de Wilkins y Walker	209
21.3.8	Método de Stargel, Thompson, Phillips, Lombard y Dowell	217
21.3.9	Método de Rowe, Todd y Waide	219
21.3.10	Método de Kerbs, Hutton y Hollister	227
21.3.11	Método de Goodfellow y Gray Cuadro de comparación con las técnicas convencionales	231 241

### CAPITULO III

<u>P</u> <u>O</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>B</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>I</u> -	
<u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>I</u> <u>O</u> <u>N</u>	242

### CAPITULO IV

<u>C</u> <u>O</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>U</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>O</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>S</u>	246
---	-----

### CAPITULO V

<u>B</u> <u>I</u> <u>B</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>O</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>A</u>	248
---	-----

## CAPITULO I

### I N T R O D U C C I O N

Una ciencia puede progresar tanto como sus métodos lo permitan, por ejemplo, la Microbiología se ha desarrollado enormemente gracias a la utilización de los macro-métodos, pero podría evolucionar más rápidamente si se aceptaran y adaptaran técnicas diferentes más satisfactorias, que permitieran procesar números cada día mayores de muestras, de una forma poco costosa; en el menor tiempo posible; la miniaturización es uno de los principales caminos - en esta dirección.

Algunos de los mayores obstáculos en la propagación del conocimiento acerca de los métodos microbiológicos miniaturizados son su propia impalpabilidad así como la poca atención que reciben los métodos en general, en la mayoría de los libros debido a que frecuentemente una técnica nueva es tratada como un adjunto al primer objeto de estudio, sin tomar en cuenta que muchas veces es la contribución más importante.

Es por eso, que este trabajo pretende proporcionar una recopilación y revisión de métodos microbiológicos miniaturizados que ayuden a los investigadores a resolver problemas específicos, cooperando de esta forma al progreso

de la Microbiología, ya que estos métodos incrementan generalmente la eficiencia del trabajo microbiológico ahorrando espacio, material, costo y tiempo. Sin embargo, este escrito no es un manual de técnicas, sino más bien es un examen de ideas que pueden ayudar a mejorar el trabajo microbiológico; en él se dan las descripciones de cada técnica de una forma lo suficientemente completa para que el lector pueda obtener ideas concernientes a sus propios intereses personales.

Para limitar este trabajo a una medida práctica se establecieron los siguientes parámetros:

- 1.- El método debe presentar algunos grados de miniaturización sobre la metodología convencional.
- 2.- El método debe utilizar células en crecimiento o evaluar una propiedad de las células que han crecido "en masa"; debe ser un método referente a un cultivo.
- 3.- El examen de los métodos estará limitado a la descripción original de cada método y sus principales modificaciones y aplicaciones, dando prioridad a aquellas que parecen tener mayor potencial en el futuro.



## CAPITULO II

M E T O D O S    M I N I A T U R I Z A D O S

Para facilitar el estudio de los métodos microbiológicos miniaturizados presentados en este capítulo, se hizo la siguiente clasificación:

1. Métodos de tubos pequeños
2. Métodos de tubo capilar
3. Métodos de gota pendiente
4. Métodos de bloque pendiente, en sandwich y similares
5. Métodos de impronta
6. Métodos de cámaras de perfusión
7. Métodos de placas pequeñas en portaobjetos
8. Métodos de cultivo sobre materiales inertes diferentes al vidrio
9. Métodos de cajas petri
10. Métodos de difusión en agar
11. Métodos de tiras de papel y discos
12. Métodos de substrato en película
13. Método del asa caliente
14. Métodos de placa dividida
15. Métodos de línea de Burri y tubos ovales
16. Métodos de placa de contacto

17. Métodos de tubo y frasco giratorios
18. Métodos de gradiente
19. Métodos de detección de reacciones tempranas mediante isótopos radiactivos
20. Métodos de cultivo "in vivo"
21. Métodos de inoculación múltiple

Es importante señalar que nos pareció conveniente comentar las características más importantes de cada método - después de su descripción, pero las observaciones generales se integran en el capítulo siguiente en donde se discuten - las posibilidades de su aplicación.

#### I. MÉTODOS DE TUBOS PEQUEÑOS.-

Los tubos de Kahn que miden 13 x 100 mm , han sido utilizados comúnmente para llevar a cabo las pruebas de tubos pequeños, no sólo porque permiten mezclar perfectamente su contenido después de haber añadido células o reactivos, sino porque además, siguen siendo lo suficientemente pequeños para limitar al medio en un volumen pequeño.

Pueden usarse también, tubos miniatura que miden 6 x 100 mm , los cuales pueden hacerse con pedazos de tubo de vidrio sellados con calor en un extremo.

En estos métodos, al ser masivo el inóculo contenido en volúmenes relativamente pequeños ya sea de reacti

tivos o de medio de cultivo, se reduce considerablemente el tiempo de incubación.

A continuación se presenta una lista de pruebas - que se realizan por el método de tubos pequeños:

- Fermentaciones de carbohidratos
- Catalasa
- Coagulasa
- Descarboxilasas
- Producción de gelatinasa
- Utilización de citrato
- Sensibilidad a antibióticos
- Producción de  $H_2S$
- Indol
- Lipasa
- Rojo de metilo
- Movilidad
- Producción de ácido nicotínico
- Reducción de nitratos
- Fosfatasa
- Hidrólisis del almidón
- Ureasa
- Viabilidad de bacterias
- Ensayos con vitaminas
- Prueba de Voges Proskauer

Algunas de estas pruebas han sido usadas ampliamente, pero otras nunca han encontrado aplicación fuera de la descripción original. Algunas de las pruebas más utilizadas son las siguientes:

### 1.1 INDOL.-

Para estudiar la producción de indol por algunas bacterias, Weaver y Arnold pusieron en tubos de 10 x 75 mm , 1 ml de triptofano al 0.03%, 1 ml-

de peptona al 0.1% y 1 ml de  $K_2HPO_4$  al 0.5% en agua destilada, pH de 7.4 ; después de que los tubos se esterilizan, se inoculan e incuban a 37°C.- Las pruebas positivas se obtienen generalmente en un límite de 2 horas y algunas pueden ser positivas en 6 minutos. McClung y Weinberg usaron un período de incubación de 15 minutos pero dos cultivos positivos requirieron de 3 a 4 horas para producir una micro-prueba fuertemente positiva. Después de la incubación se ponen en cada tubo, 4 gotas de reactivo de Kovac modificado (5 g. de p-dimetil-amino-benzaldehído, 75 ml de alcohol isoamílico y 25 ml de HCl concentrado). Se ha utilizado el substrato en forma de tableta la cual contiene 1 mg de triptofano, 10 mg de NaCl y 50 mg de fosfato dicálcico, se disuelve en agua destilada y se inocula después el tubo, efectuándose la reacción para detectar la presencia de indol después de 4 a 6 horas de incubación.

Se ha observado que la fuente del inóculo puede afectar la extensión del período de incubación necesario para obtener pruebas positivas. Por ejemplo, se encontró que el inóculo que provenía de un medio de agar-glucosa necesitaba más tiempo de incubación (2-3 horas) que el que provenía de un medio de agar-suero (1 hora). Para mayor seguridad, algunos investigadores utilizaron 4 horas de incubación, independientemente de la fuente del inóculo.

El reactivo de Kovac resultó ser más conveniente y sensible que el de Ehrlich para la detección de indol.

### 1.2. VOGES PROSKAUER (VP).-

Fabrizio y Weaver estudiaron la microprueba de Voges Proskauer poniendo un medio de cultivo -- con 0.7% de glucosa, 1.0% de tripticasa, 0.5% de NaCl en infusión filtrada de carne de caballo, con un pH de 6.8. Se colocan 0,5 ml de este medio, y se inocula con un cultivo de 10 a 12 horas de incubación. Después se incuba 90 min a 30°C y se le añaden 0.15 ml de solución de alfa-naftol al 5% en etanol de 95%; se agita el tubo durante 5 segundos y luego se le añaden 0.05 ml de solución de KOH al 40%, conteniendo creatina al 0.3%; se vuelve a agitar el tubo 5 segundos y después de 30 minutos se examina para observar la reacción roja de Voges - Proskauer. Dado que los períodos largos de incubación antes de la adición de los reactivos o de la agitación incrementan la sensibilidad de la prueba, se prefieren utilizar 4 horas de incubación para evitar la aparición de reacciones positivas falsas.

### 1.3 CITRATO.-

El medio utilizado contiene citrato de sodio al 0.5%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 0.25% y agar al 0.4%; pH de 6.4 .

Se precalientan en un tubo 1.5 ml de medio en un baño de agua, y cuando están a 37°C se colocan 3 mm de cultivo joven sobre la superficie del medio; después de incubar 2 horas se añade a cada tubo una gota de azul de bromotimol al 0.05%; un color azul indica una reacción positiva. El agar localiza al inóculo siendo más rápidamente detectable un cambio de pH en los alrededores del inóculo que en todo el tubo.

#### 1.4 FERMENTACIONES DE CARBOHIDRATOS.-

Existe una variedad de microtécnicas para de terminar las reacciones de fermentación de carbohi dratos. Para la de tubos pequeños se utilizan los tubos de fermentación de Durham de 8 x 35 mm que - se llenan a la mitad con agar que contenga 0.1% de púrpura de bromocresol y se añaden 2 gotas de solu ción del azúcar y una gota de la suspensión de cé- lulas en la superficie; se incuba 24 horas a 37°C. Bicknell usó un medio semi-sólido para poder detec tar la formación de burbujas.

Davis, simplemente colocó una pequeña canti- dad de carbohidrato sólido en tubos pequeños que - contenían tubos de fermentación de Durham; añadió suspensión de células que tenían un indicador de - pH, y observó la producción de ácido y gas después de 24 horas.

Bergquist y Searcy, usaron 0.3 ml de caldo rojo de fenol (Difco) y añadieron 1% de carbohidrato en tubos de 6 x 50 mm , conteniendo un tubo capilar de 1.4 x 10 mm sellado en uno de sus extremos, para la detección de gas.

Otras microtécnicas para fermentaciones utilizan el substrato en tabletas, las cuales resultan interesantes porque tienen un gel que permite la detección de gas.

Los métodos de tubos pequeños pueden ser tan sensibles como las macrotécnicas, ya que se han obtenido resultados equivalentes; además de que en el proceso de microcultivo pueden hacerse modificaciones tales como alargar el período de incubación para obtener un incremento en la sensibilidad y detectar diferencias cuantitativas entre cultivos, los cuales podrían parecer idénticos al ser analizados por métodos estándar.

## 2. MÉTODOS DE TUBO CAPILAR.

Cuando los métodos de tubos pequeños son miniaturizados a tal grado que el diámetro del tubo se vuelve lo bastante pequeño como para obtener capilaridad, el método viene a ser un método de tubo capilar.

La idea no es nueva, ya que en 1873 Klebs usó una cámara capilar para estudiar la germinación de una esporas, el crecimiento celular y la formación de una colonia, microscópicamente.

Algunas aplicaciones son las siguientes:

### 2.1 PARA EL AISLAMIENTO DE CELULAS INDIVIDUALES.

Este método fué descrito por Hildebrand y El Brady; en él, los tubos capilares se llenan con esporas o con suspensiones celulares y después se --rompen en pedazos conteniendo organismos individuales que se usan para inocular un medio estéril. En lugar de romper el tubo las células pueden ser extraídas con una jeringa micrométrica.

El método es muy satisfactorio para el aislamiento de células individuales de anaerobios pero tiene algunas desventajas al usarse para aerobios porque después de la incubación ocurre un rápido agotamiento del oxígeno dentro del tubo; este problema puede solucionarse si se utilizan tubos de plástico, permeables al oxígeno.



## 2.2 PARA ESTUDIAR LA MICROFLORA DEL AGUA Y DEL SUELO.

Chesters, utilizó un método de tubo capilar para estudiar la microflora del suelo y para el -- aislamiento de hongos. Los tubos capilares se sellan a las paredes de un tubo largo; después este tubo grande se llena con medio de cultivo fundido y enfriado, y luego se sumerge en el suelo. Los microorganismos del suelo crecen a lo largo del capilar y se forman colonias dentro del tubo largo de donde se subcultivan.

## 2.3 PARA ESTUDIAR QUIMIOTACTISMO.

Adler, en 1966, usó un tubo capilar para el estudio del quimiotactismo bacteriano, para lo -- cual colocó cerca de  $10^6$  células de *E. coli* en un extremo del tubo capilar y del otro lado puso una fuente de carbón; después selló los extremos del tubo con agar y con un tapón de plastilina y observó que las bacterias se movían del punto de origen a la fuente de carbón, formándose una o dos bandas bien marcadas, lo cual indica la respuesta quimiotáctica.

## 2.4 PARA PRUEBAS DE FERMENTACION.

### 2.4.1 Método de Morris y Kirsop.

Estos autores determinaron la capacidad fermentativa de levaduras mezclando una


suspensión de levaduras con substrato, dejando subir la mezcla por un tubo capilar - y encajando uno de los extremos del tubo capilar en un bloque de plastilina sobre un portaobjetos. El otro extremo se tapa también con plastilina y se marca con plumón - el nivel a donde llega la suspensión; de esta manera puede detectarse rápidamente la formación de ácido (adicionando un indicador a la suspensión) y gas.

#### 2.4.2 Método de Tröger. -

Tröger propuso colocar extracto de levadura, peptona y agar en una caja petri colocada en un ángulo de 45°; el agar solidifica en un extremo de la placa y después se inocula. Los tubos capilares, llenos con soluciones de carbohidratos se introducen dentro del agar inclinado; de esta forma -- quedan inoculados y sellados al mismo tiempo por el agar, de modo que puede observarse la acumulación de gas en los tubos.

#### 2.5 PARA ESTUDIAR LOS EFECTOS DE OXIGENO EN BACTERIAS. -

Sherris, describió un método para seguir las respuestas de una bacteria móvil encerrada en capilares planos, el cual se usó para el estudio de -- los efectos del oxígeno.

Se estira un tubo de vidrio después de calentarlo, haciéndolo con la forma siguiente: ; el capilar plano forma el travesaño. Se une un extremo del capilar con un tubo de goma a un cilindro de gas, mientras que el otro extremo se sostiene por debajo de la superficie de una suspensión bacteriana; después de que el gas reemplaza al aire del capilar, se cierra el cilindro y se aprieta el tubo de goma, se separa el cilindro y se recoge en el capilar una columna de la suspensión bacteriana; después se sellan los extremos del tubo y quedan en contacto la suspensión bacteriana y el gas. Para observar al microscopio se puede montar el capilar en una capa de inmersión y ver a 50X.

Clarke y Cowan establecieron que las pruebas de tubos capilares eran más simples de llevar a cabo y de leer, en comparación con otros métodos para efectuar pruebas fisiológicas de microorganismos, pero que en determinaciones rutinarias eran mejores las pruebas de tubos.

### 3. MÉTODOS DE GOTA PENDIENTE.-

#### 3.1 GOTA PENDIENTE SIMPLE.-

La preparación de la gota pendiente simple - es más eficaz si se aplica la gota al cubreobjetos, al cual se le ponen 4 gotitas de vaselina en cada una de las esquinas y después se presiona la parte cóncava del portaobjetos contra el cubreobjetos, - haciendo que la vaselina haga contacto con la parte plana del portaobjetos y que la gota quede acomodada en la parte cóncava. Se invierte la preparación y se le puede poner más vaselina para hacer una cámara completamente cerrada, como se muestra en la siguiente figura:

Se tienen problemas ópticos debido a que por lo menos hay tres índi-



ces de refracción diferentes involucrados, tomando en cuenta que existe una capa de aire. La situación empeora debido a la curvatura de la concavidad del portaobjetos así como a la curvatura de la gotita, por lo que una microscopía realmente buena no es posible con preparaciones de gota pendiente si se utiliza un portaobjetos excavado; en su lugar, se ha usado un portaobjetos plano y el cubreobjetos debe entonces colocarse sobre una plataforma de grasa o de plastilina; a veces es recomenda-

ble un portaobjetos excavado pero con piso plano,

A pesar de que este método ha presentado algunas inconveniencias, se utiliza para muchos propósitos como son: la observación de la movilidad, microcultivos para estudiar la relación entre los tiempos de generación de células y la temperatura (Barber), estudios de la morfología fúngica, pruebas de fermentación.

### 3.1.1 Método de Barber.-

Barber, transfirió células individuales de un inóculo de gota pendiente a otros cubreobjetos para formar cultivos de células individuales en gota pendiente, los cuales fueron mantenidos a diferentes temperaturas por períodos determinados de tiempo. Después hacía morir a las células y las teñía ligeramente al inyectar una microgota de azul de metileno y de KOH.

Entonces los organismos producidos en un tiempo determinado fueron contados, y por el número y la medida de las células se calcularon los tiempos de generación a diferentes temperaturas.

### 3.1.2 Método de Blank.-

Blank, describió una técnica modifica-

da de gota pendiente para la observación de hongos. Se coloca una pequeña gota de suspensión de esporas en un medio de cultivo sobre un cubreobjetos largo de 22 mm y se coloca un cubreobjetos pequeño directamente sobre la gota; el cubreobjetos largo se invierte sobre la depresión de un portaobjetos de cultivo y se sella en ese lugar. La pequeña cantidad de medio disponible limita el crecimiento micelial, por lo que el crecimiento y la esporulación son fácilmente observados. A pesar de que este método tiene varias ventajas sobre la mayoría de las técnicas de bloque pendiente para el examen de la morfología fúngica, pocos investigadores lo utilizan.

### 3.1.3 Método de Lindner.-

Lindner utilizó portaobjetos excavados para llevar a cabo pruebas de fermentación para la identificación de cultivos. Para ello, se coloca una suspensión de levaduras o de otros microorganismos en un medio estéril sobre la parte cóncava del portaobjeto, se le añade una pequeña cantidad de substrato y se sella con un cubreobjetos y vaselina, sin permitir la formación de burbujas de aire. Después de la incubación, la fermentación se estima por la medida de las burbu-

jas de gas bajo el cubreobjetos. Kocwa, - mezcló las células y el substrato en los de pósitos de los portaobjetos excavados, para detectar la fermentación de carbohidratos - como en los métodos de tubos pequeños. Casi todas las pruebas de tubo pequeño pueden con una pequeña modificación llevarse a cabo en portaobjetos excavados o en placas de sechables. La prueba del portaobjetos para la actividad de la coagulasa es el ejemplo-mejor conocido, en este caso se hace una -- suspensión homogénea de una colonia a pro-- bar, en una gota de agua colocada sobre un portaobjetos, esparciéndola lo menos posible. Después se mezcla con la suspensión, - una asada grande de Plasma Bacto-Coagulasa (Difco) rehidratado o de plasma fresco, y - se observa que los microorganismos coagula- sa positiva producen un agrupamiento macros- cópico en 5-15 segundos; el agrupamiento re tardado no indica una prueba positiva. Esta técnica es particularmente útil en la -- identificación presuntiva de estafilococos coagulasa positivos.

### 3.2 GOTA PENDIENTE CON BAÑO DE ACEITE.-

Fonbrune publicó una versión del método ori-

ginal de Barber, en el cual usó micromanipuladores de alta calidad en conjunto con una cámara de aceite. Su método fué modificado posteriormente por algunos investigadores tales como Lederberg y Nossal; las variantes son las siguientes:

### 3.2.1 Método de Webley y Farmer.-

Ellos describieron un método para producir microcultivos en gotas pendientes. Se esparce una suspensión diluída de un microorganismo sobre un cubreobjetos tratado con una película repelente al agua, de modo que en el cubreobjetos queden muchas pequeñas gotitas, cada una con un borde circular; el cubreobjetos se invierte sobre un portaobjetos excavado que tiene parafina líquida. -- Las gotitas pueden ser observadas durante los períodos de incubación de 4 a 5 días; cada gotita contiene de ninguna a pocas células.

### 3.2.2 Método de Lederberg.-

Consiste en marcar una cuadrícula en el reverso de un portaobjetos, el cual se cubre con aceite de parafina a un espesor de 0.5 mm y se coloca una pequeña gota de cultivo en el centro de cada cuadro con una pipeta capilar; las gotas se esparcen a un



diámetro de 0.1 a 0.2 mm , y entonces cada una puede examinarse microscópicamente. De esta manera se aíslan directamente células individuales, o bien, se añade una gota de medio pequeña y se incuba por más tiempo para el desarrollo de microcolonias; cuando la incubación tiene que prolongarse, se invierte la preparación del cubreobjetos sobre un depósito rectangular lleno de aceite.

### 3.2.3 Método de Michael.-

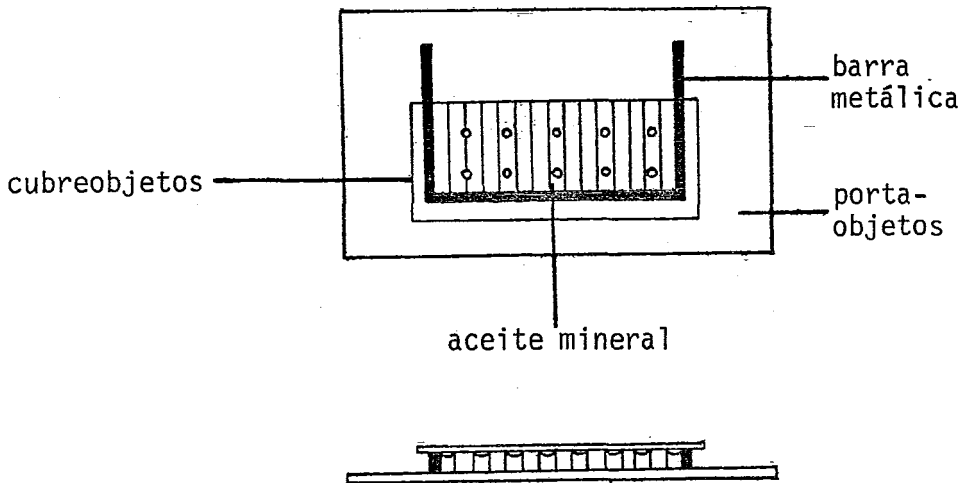
Una gota de aceite de inmersión se esparce sobre un portaobjetos para cubrir un área ligeramente más larga que la de un cubreobjetos; se coloca una asada de cultivo sobre el aceite y se pone un cubreobjetos sobre la película; se sella con una presión ligera, y entonces la asada de cultivo queda atrapada en el aceite en forma de muchas gotitas pequeñas. Este método es muy bueno para el examen microscópico de crecimiento temprano y de movilidad, pero no es satisfactorio para el aislamiento de cultivos -- porque las gotitas se desordenan.

### 3.2.4 Método de Nossal.-

La producción de anticuerpos por las-

células del nódulo linfático en microgotas fué reportada por Nossal, quien resumió un número de estudios sobre el efecto de anticuerpos sobre la inmovilización bacteriana.

En esta técnica, se divide un cubreobjetos limpio de 1 x 2 pulgadas en 9 rectángulos, marcándolos por el reverso con tinta china; después se coloca sobre una cámara de aceite la cual consta de tres barras de metal pegadas a un portaobjetos, dejando libre un lado.



El aceite mineral se esparce formando una capa delgada sobre la superficie del cubreobjetos (por la parte no marcada). Con-

una pipeta de un diámetro de 5  $\mu\text{m}$  se depositan gotitas de suspensión de células de nódulo linfático sobre la superficie del cubreobjetos, sobre la capa de aceite, la cual disminuye la evaporación. Es conveniente añadir antes de la incubación una pequeña cantidad de medio a todas las microgotitas. Se invierte el cubreobjetos y el espacio se llena con aceite mineral. Se incubaba la cámara durante 4 horas a 37°C y después se agregan cerca de 10 bacterias móviles a cada gotita, las cuales después serán examinadas en intervalos de tiempo determinados para ver si existe una inhibición al ocurrir la pérdida total de la movilidad.

La técnica del baño de aceite se ha encontrado apropiada para cultivos de células animales, ya que el aceite de parafina es biológicamente neutral y además es permeable a los gases permitiendo el intercambio de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  entre la gotita suspendida y la atmósfera.

#### 4. MÉTODOS DE BLOQUE PENDIENTE, EN SANDWICH Y SIMILARES.-

Para estos métodos se recomienda incubar dentro de una cámara húmeda, siendo una de las más usadas la caja petri, la cual puede colocarse en bolsas de plástico para disminuir la evaporación, o bien, se le coloca dentro agua, papel filtro húmedo, algodón o esponja para dar una atmósfera húmeda satisfactoria. Incluso cuando se desean varios grados de humedad se adicionan pequeñas cantidades de sal al agua, o se usa 20% de glicerol en el agua.

Los portaobjetos generalmente se colocan sobre piezas de vidrio o tubo de metal que se encuentran sobre el agente humectante.

A continuación se muestran variaciones en los métodos según sea su uso.

##### 4.1 PARA MICROCULTIVO DE HONGOS.-

Para cultivar hongos, el medio debe ser limitado de nutrientes para impedir que exista un crecimiento muy denso del micelio lo cual podría obscurecer los detalles de la estructura.

##### 4.1.1 Método de Duncan.-

En los últimos años del siglo XIX se

desarrollaron varios métodos para facilitar el estudio microscópico de los hongos. La preparación más comúnmente usada fué originada por Duncan, la cual consiste en inocular un bloque de agar de diámetro más pequeño que el cubreobjetos, sobre los 4 extremos; se cubre después con el cubreobjetos y se incuba en una cámara húmeda. Cuando el crecimiento ya es el deseado se quita el cubreobjetos y se pone sobre una gota de fluido para montaje, colocada sobre un portaobjetos para la observación; así mismo se puede quitar el agar del portaobjetos original, quedando una segunda preparación para el estudio.

También puede usarse el desarrollo obtenido en una caja petri que tenga una capa muy delgada de agar, se corta un bloque y se coloca boca abajo sobre un cubreobjetos, se le añade una gota de formalina al 10% y después de algunos minutos se quita el exceso de formalina con papel secante, se coloca el bloque sobre un portaobjetos y el espacio que rodea al delgado bloque se llena con medio de montaje.

#### 4.1.2 Método de Henrici.-

En este método, se sella un cubreobje

tos rectangular a un portaobjetos con una gota de cera en cada extremo, dejando un espacio de 1 mm de espesor entre las dos superficies de vidrio. Después se deja correr agar inoculado bajo el cubreobjetos hasta que se llene una parte del espacio, y luego se incuba en una cámara húmeda.

Esta técnica ha encontrado una amplia aceptación.

#### 4.1.3 Método de Hejtmánková-Uhrová.-

Estos autores utilizaron un doble bloque para estudiar la formación de ascosporas por *Microsporon gypseum*, para lo cual colocaron dos cilindros de agar de 2 mm de alto y 5 mm de diámetro, en un portaobjetos, dejando entre los dos una distancia de 1 cm; encima de los cilindros pusieron una tela de crin para conectarlos por un puente, y después inocularon un par de cultivos compatibles, cada uno en un cilindro. Se cubrió la preparación con un cubreobjetos largo y se incubó en una cámara húmeda.

#### 4.1.4 Método de Cooper.-

Cooper usa una caja de plástico con una tapa que tiene una excavación, para fa-

cilitar el examen de cultivos de *Candida*, - reduciendo el riesgo de infección. En este caso, el medio de cultivo se esparce sobre la superficie interior de la tapa excavada; se ponen 0.5 ml de glicerol estéril al 10% en agua, alrededor de la periferia del fondo de la caja, y se sella la caja con cinta de celofán. Se observan las preparaciones con objetivo 45X. En otras ocasiones un -- bloque de agar de 1/4 de pulgada por lado, - y 1/8 de pulgada de espesor se coloca en el fondo de la caja de Cooper; después el bloque se inocula en sus extremos y se vuelve a colocar la tapa, presionándola hacia abajo, se sella la caja con masking tape o con parafina fundida.

#### 4.2 PARA MICROCULTIVO DE BACTERIAS.-

Las limitaciones de los frotis teñidos y - las preparaciones de gota pendiente para el estu-- dio de la morfología bacteriana fueron registradas por Robert Koch, quien recomendó cultivos en portaobjetos con medio semi-sólido para examinar microscópicamente el crecimiento bacteriano.

##### 4.2.1 Método de Hill.-

Siguendo el trabajo de Koch, Hill -

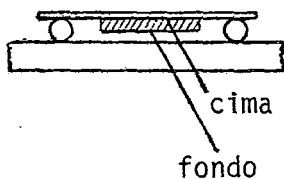
describió un método de bloque pendiente para el estudio de bacterias durante el crecimiento; parece ser que Hill fué el primero en originar este tipo de técnica, la cual sirvió de base a muchos otros métodos.

En este método, se vierte agar fundido en una caja petri hasta formar un espesor de cerca de  $1/8$  a  $1/4$  de pulgada; se deja enfriar y después se corta un bloque de  $1/4$  a  $1/3$  de pulgada por lado y del grueso de la capa de agar de la caja petri. Este bloque tiene una superficie plana por arriba y por abajo. Se pone la superficie inferior sobre un portaobjetos, se prepara una emulsión en agua estéril del organismo y se esparce sobre la cara superior del bloque. Se colocan el portaobjetos y el bloque en una incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 a 10 min para secar levemente. Después se coloca un cubreobjetos sobre la superficie inoculada del bloque evitando que se formen burbujas de aire. Se quita el portaobjetos de la superficie inferior y con una asa se dejan correr 2 gotas de agar fundido a lo largo de cada lado del bloque de agar, ahora colocado sobre el cubreobjetos, para llenar los ángulos entre



ambos; este sello evita que se deslice el bloque. Se coloca en la incubadora 5-10 minutos para secar el sello de agar; se invierte la preparación sobre una cámara húmeda y se sella el cubreobjetos en el lugar con parafina. Puede observarse la preparación en tiempos variables.

Esta técnica tiene el inconveniente de que las condiciones ópticas son muy pobres para lo cual primerose debe reducir el espesor del bloque de agar a uno más chico de 1 mm y al mismo tiempo se debe reducir el espesor del espacio de aire por debajo de él; se elimina este espacio llenándolo con agua o medio nutritivo para formar un bloque pendiente con líquido.



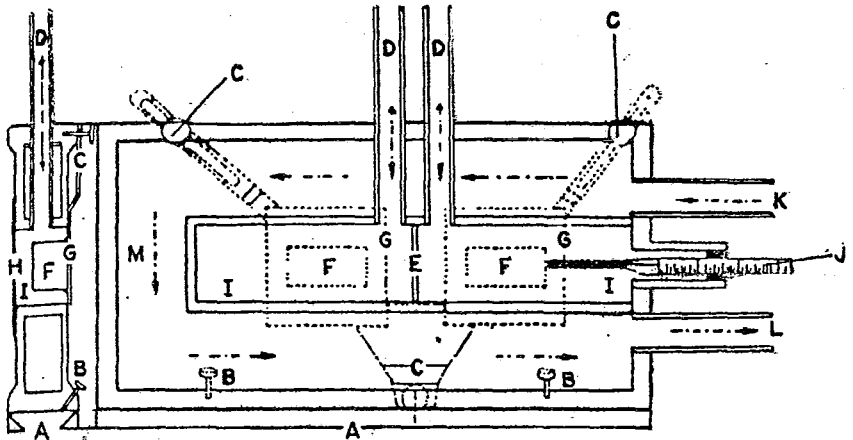
bloque pendiente



bloque pendiente  
con líquido.

Las bacterias anaeróbicas también pueden cultivarse fácilmente en un microculti-

vo; probablemente fué Hill, el primero en cultivar microorganismos anaerobios en cultivos de portaobjetos; las preparaciones fueron selladas con paráfina. Para dar las condiciones anaeróbicas, se coloca una pequeña taza conteniendo pirogalol en la cámara húmeda, la cual se cierra herméticamente. La cámara más sofisticada, esquematizada a continuación, permite la circulación de agua y aire alrededor del bloque pendiente suspendido.



sección  
vertical

sección horizontal

Esta cámara mide 3 1/2 x 2 pulgadas, - y está hecha de bronce. A, pestaña para -- unir esta cámara a una mecánica; B, tornillos para ajustar; C, pinzas de apretar pa

ra sujetar los cubreobjetos; D, conductos que se conectan con la cámara húmeda; E, división entre las cámaras; F, bloque de agar pendiente; G, cubreobjetos; H, portaobjetos pegado a la base de la cámara; I, cámaras húmedas; J, termómetro; K, L, tubos de entrada y salida para agua tibia; M, espacio del agua. La sección vertical es una mezcla de varios planos de las secciones.

#### 4.2.2 Método de Graham-Smith.-

En este método se coloca agar fundido sobre un portaobjetos estéril y se esparce con una aguja tibia, formando una superficie cuadrada; se deja solidificar y se coloca una pequeña gota de suspensión bacteriana sobre la superficie de agar; se cubre con un cubreobjetos. El exceso de agar se corta y se quita de los lados, después se sella el cubreobjetos al portaobjetos con vaselina fundida.

#### 4.2.3 Método de Hewlett.-

Este método es una forma de bloque pendiente en donde el bloque es reducido a una capa delgada de agar. En este método se vierte una capa delgada de agar sobre la superficie de un cubreobjetos; después de que gelifica, se inocula esparciendo sobre él una pequeña cantidad de cultivo diluido

y se invierte el cubreobjetos sobre una cámara húmeda. El resultado neto es un bloque pendiente muy delgado; el espacio de aire puede llenarse con líquido pero la bacteria puede ser arrastrada con él. El mayor inconveniente de este método es la incapacidad visual bajo el objetivo de inmersión, ya que la capa de células está usualmente fuera de la distancia focal de las lentes.

#### 4.2.4 Método de Welch.-

En este método se ponen 3 tiras de vidrio en un tubo de ensayo largo y se llena a 1/5 parte con agar; se deja enfriar a 45 °C, se inocula el tubo y se inclina. Las tiras de vidrio quedan cubiertas por el agar. Para la observación, se saca una tira y se coloca un cubreobjetos sobre el agar que queda de un lado de la tira, limpiando el otro lado de ella. La ventaja de este método es que el tubo sirve como una cámara húmeda además de que como la capa de agar es más gruesa en el fondo del tubo, basta mover la tira para observar menos colonias.

#### 4.2.5 Método de Hoffman y Frank.-

En este método se sumerge un cubreobje-

jetos de 20 x 30 mm en etanol al 95%, se deja escurrir el exceso sobre un papel secante, y después se flamea. Posteriormente se inclina el cubreobjetos a 45° y se hace rodar una gota de agar caliente sobre la superficie dejando una línea delgada de agar en el centro. Después de 1 min que se deja secar, se hace correr una gota de inóculo por la línea de agar y el exceso se escurre poniendo la esquina en un matraz durante 2-5 min. Después se quitan los extremos de la línea de agar con una navaja, dejando en el centro un bloque cuadrado de agar de 3 mm. Posteriormente el cubreobjetos es invertido sobre una cámara, formada por dos cubreobjetos separados 1 cm sobre un portaobjetos de vidrio. Se sella la cámara con parafina para prevenir que se seque. Se puede observar con el objetivo de inmersión 100X.

Para períodos largos de incubación se sella el cubreobjetos al portaobjetos sólo por dos lados para permitir el acceso de aire y la adición periódica de agua para mantener húmeda la preparación. También durante la incubación se puede poner en cámara húmeda.

#### 4.2.6 Método de Orskov.-

En este método se vierte agar en una caja petri estéril hasta lograr un espesor de 2-3 mm. Se coloca una gota del inóculo en el centro de la placa y se esparce con una varilla de vidrio doblada, para lograr una inoculación homogénea. Se cortan pequeños bloques de agar y se colocan sobre portaobjetos esterilizados. Después se aplica un cubreobjetos en la superficie de cada bloque de agar inoculado.

#### 4.2.7 Método de Knaysi.-

El agar se aplica al portaobjetos entre dos cubreobjetos formando un pequeño túmulo. La cima del túmulo es inoculada y después se pone un portaobjetos para cubrir la, haciendo contacto con la cima. Se sella la cámara con una mezcla de parafina y vaselina. Este tipo de preparación es especialmente útil en estudios fotomicrográficos del crecimiento de bacterias y levaduras.

#### 4.2.8 Método de Hort.-

En este caso, la capa de agar se forma al verter agar directamente sobre el portaobjetos; después se deposita una pequeña

gotita de inóculo sobre el cubreobjetos y - éste se invierte y se presiona sobre la superficie de agar antes de que se seque el inóculo; por último se sella.

#### 4.2.9 Método de Fleming.-

El cultivo se esparce sobre un cubreobjetos estéril y se deja secar. Después se gotea agar con penicilina a una temperatura de 45°C sobre el cubreobjetos y se deja solidificar; luego, se invierte el cubreobjetos sobre un portaobjetos y se incuba.- Cuando el cubreobjetos se retira con unos forceps, todo el agar se adhiere a él y no hay disturbios del cultivo. El cubreobjetos con el agar puede fijarse con formalina y cuando la fijación es completa puede quitarse el agar suavemente, dejando sobre el cubreobjetos una muestra casi inalterada, - que puede ser teñida.

Esta técnica puede usarse para estudios de reacciones de especies variadas de bacterias a la penicilina, estreptomycin, terramicina, etc.

Este método es muy perjudicial para las bacterias, ya que involucra dos fuentes

de shock. La primera, es el simple proceso de secado lo cual es un peligro para la célula, que puede provocarle la muerte; la segunda es el peligro de vertir agar caliente a 45°C, ya que esta temperatura excede el límite para el crecimiento de muchas especies y pueden morir un porcentaje alto de células. El método debe mejorarse, aplicando el agar antes de que se seque la gota de cultivo, y la preparación debe ser invertida sobre el portaobjetos antes de que el agar quede solidificado. De esta forma, existe un contacto mejor con el portaobjetos y el calor del agar puede diseminarse más rápidamente.

#### 4.3 OTRAS VARIANTES.-

##### 4.3.1 Método de Klienberger y Smiles.-

Para obtener bloques uniformes con superficies planas, estos investigadores usaron anillos de metal paralelos de 2 mm de alto cada uno. Cada anillo era bañado en cera caliente, se sellaba a un portaobjetos y se llenaba lentamente con agar cerca del nivel del anillo. Se colocaba una asada del inóculo sobre la superficie del agar y



después se sellaba al anillo un cubreobje--  
tos redondo, presionando el cubreobjetos --  
con un anillo de metal caliente.

#### 4.3.2 Método de Hewitt.-

Hewitt mostró que el índice de refracci  
ción de la gelatina al 30% así como su bajo  
punto de fusión la hacían superior al agar  
como agente solidificante para ciertas in--  
vestigaciones, utilizando cultivo en porta-  
objetos. La resolución incrementada obtenini  
ble con gelatina fué probablemente una ra-  
zón del por qué varios investigadores obtu-  
vieron preparaciones microscópicas muy ade-  
cuadas así como fotomicrografías.

## 5. METODOS DE IMPRONTA.-

Axelrad en 1903 y posteriormente un número grande de investigadores hicieron improntas sobre cubreobjetos, de colonias que estaban creciendo en cajas petri, las cuales eran teñidas después para el examen microscópico; estas preparaciones son ya una técnica aceptada que sirven para hacer diagnósticos rápidos y sensibles.

### 5.1 METODOS DE CULTIVO, DE ADHESION.-

#### 5.1.1 Método de Lindner.-

Lindner cultivó una bacteria de la superficie de la lengua con un método de cultivo de adhesión. Tocó la lengua con un cubreobjetos y la película resultante se dejó secar; después lo inundó con agar nutritivo y luego lo incubó. De esta manera se aislaron muchas microcolonias que se pueden transferir para estudios posteriores.

#### 5.1.2 Método de Fleming.-

Se esparce un cultivo sobre un cubreobjetos y se deja secar; luego se vierte agar fundido y a 45°C sobre el cubreobjetos, se deja solidificar y después se invierte el cubreobjetos sobre un portaobjetos. Después de obtener crecimiento se quita el cu-

breobjetos con unos forceps y se fija toda la preparación con formalina. Puede quitarse el agar suavemente dejando sobre el cubreobjetos un patrón de la bacteria.

#### 5.1.3 Método de Dobell.-

Dobell estudió amibas colocando cubreobjetos sobre cultivos; las amibas se enjamban sobre el cubreobjetos y se adhieren al vidrio, después se levanta el cubreobjetos y se fijan y tiñen las amibas.

#### 5.1.4 Método de Dubey y Das.-

Mejoraron la técnica anterior para lo cual se pone una gota de agar no nutritivo, caliente, sobre un cubreobjetos cuadrado; inmediatamente se tapa con un cubreobjetos redondo más pequeño; se quita después el cubreobjetos redondo, dejando una película delgada de agar sobre el cubreobjetos cuadrado. Este último se invierte sobre un portaobjetos excavado, lleno con un cultivo en medio líquido. El fluído extra se quita con un papel filtro y después se invierte la cavidad del portaobjetos; se incuba a 37°C durante un día. El cubreobjetos se quita después de la incubación, se fija y se pone en alcohol al 90% por 24 horas, des

pués se cambia gradualmente a agua. Se despega con una aguja la película de agar alredor de la periferia, quedando una capa de amibas que penetraron a través del agar y - quedaron adheridas al vidrio durante el período de incubación a 37°C.

## 5.2 PORTAOBJETOS ENTERRADO O TECNICAS DE INMERSION.-

Estas técnicas fueron descritas para el examen microscópico directo de organismos en el suelo. La tierra fué mezclada con gelatina u otro - agente para facilitar la fijación de los microorganismos al portaobjetos para los procesos de tinción subsecuentes.

### 5.2.1 Método de Casida.-

Este método para aislar células directamente de la tierra se basa en la observación de que la microflora del suelo - puede ser teñida con naranja de Acridina.

La tierra se tiñe con naranja de Acridina y se esparce sobre la superficie de - una película de agar, colocada sobre un -- portaobjetos. En algunos casos los portaobjetos se incuban hasta que se forman microcolonias. La transferencia de una célu

la individual o de una porción de la micro colonia se lleva a cabo sacando fuera la - pequeña cantidad de agar sobre el cual se quedaron las células; entonces las células se colocan sobre un medio en cajas petri.

#### 5.2.2 Método de Cholodny.-

Cholodny dejó cubreobjetos sumergidos en agua y estudió las bacterias que se - - adherían. Enterró cubreobjetos en el suelo por períodos suficientemente grandes -- (arriba de varias semanas), entonces los - microorganismos del suelo podían crecer y adherirse al cubreobjetos en un arreglo na tural. Este método ha sido muy usado para el estudio de la flora del suelo, especiall mente en relación a la patología de las -- plantas. Fué utilizado para obtener im- - prontas de cultivos de microorganismos en la vecindad inmediata de las raíces, colocando portaobjetos estériles directamente por debajo de la semilla de modo que al -- crecer, las raíces hacían contacto con los portaobjetos.

#### 5.2.3 Método de Kriuchkova.-

Muchas modificaciones de la técnica anterior fueron reportadas por varios in--

vestigadores, por ejemplo, Kriuchkova hizo películas de agar que contenían varios nutrientes antes de enterrar los portaobjetos. También utilizó otros materiales, tales como la celulosa para enterrar, y después sometía las preparaciones a un examen de laboratorio.

#### 5.2.4 Método de Thornton.-

Thornton usó placas de inmersión protegidas para el aislamiento de microorganismos, especialmente para los hongos del suelo. Estas placas son portaobjetos que tienen una capa de agar, ajustados a una caja de Perspex de paredes delgadas. Se hacen orificios de 5 mm de diámetro en la tapa de Perspex, la cual cubre, pero no toca la película de agar. Las placas de inmersión así protegidas se incuban en el suelo. Se obtienen las colonias del interior.

#### 5.2.5 Método de La Touche.-

Consiste en una "trampa" de portaobjetos, la cual se hace uniendo con un alambre dos portaobjetos excavados que contienen colocadas pequeñas cantidades de agar en sus concavidades. Se ponen con las ex-

cavaciones opuestas entre sí, y se deja un pequeño hueco entre los portaobjetos, en donde crecen los hongos del suelo para acercarse al medio de cultivo de las cavidades.

#### 5.2.6 Método de Sewell.-

Este es otro método de portaobjetos --- trampa para el aislamiento de hongos. Su método consiste en sellar a una tira de Perspex de la medida de un portaobjetos, otras tres - tiras de Perspex de  $1/8 \times 3/32 \times 1$  pulgadas:- una en cada extremo y la otra a una pulgada - del extremo. Se esparce el agar sobre la tira de Perspex y después se cubre con un portaobjetos estéril. El montaje se sujeta con dos clips y después se entierra. Posteriormente se recuperan los portaobjetos y las pequeñas secciones del agar para recuperar a -- los hongos.

#### 5.2.7 Método de Dobbs y Hinson.-

Ellos hicieron un método muy simple, de entrampamiento con un hueco. Se ponen dos -- portaobjetos juntos, con ligas de hule, éstos se encuentran en contacto en un extremo pero se dejan separados en el otro por una fibra - de vidrio de 0.7 mm de grueso. El micelio se esparce de un extremo del portaobjetos hacia

la cavidad durante el entierro de los porta-  
objetos.

#### 5.2.8 Método de Causey.-

El obtuvo muestras de vida acuática mi-  
croscópica sumergiendo cajas de plástico lle-  
nas de portaobjetos limpios en el medio am-  
biente deseado. A las cajas se les quitan -  
los lados para exponer lo más posible los --  
portaobjetos a sus alrededores. Como las bi-  
sagras y los broches se dañan con el agua de  
mar, se deben sujetar las cajas con una - -  
cuerda nylon que las mantenga por debajo de  
la superficie del agua.

### 5.3 PRUEBAS DE GERMINACION DE ESPORAS.-

#### 5.3.1 Método de Reddick y Wallace.-

Un método miniaturizado en condiciones  
naturales en el campo, es el sugerido por --  
Reddick y Wallace para evaluar la efectivi--  
dad fungicida de los aerosoles. Los portaob-  
jetos o cubreobjetos se rocían con algún ae-  
rosol que tenga el compuesto a evaluar; des-  
pués se colocan esporas secas de *Venturia* --  
*inaequalis* sobre la superficie del vidrio en  
una gota de agua para germinar y se evalúa -  
microscópicamente el progreso de la germina-



ción de la espora en comparación con un control.

#### 5.3.2 Método de Horsfall.-

Mejoró el método anterior, ya que como las gotas de agua no se esparcen uniformemente sobre las superficies de vidrio, el propósito un método de recubrimiento del portaobjetos con nitrato de celulosa, obteniéndose de esta manera gotas uniformes de 7.5 mm de diámetro.

#### 5.4 COLECCION DE ESPECIMENES CON CINTA DE CELOFAN.-

##### 5.4.1 Método de Edwards.-

Edwards reportó un método de contacto con cinta adhesiva para coleccionar especímenes de hongos. Unas tiras de acetato transparentes y engomadas, se presionan contra el área por examinar y después se presionan sobre un portaobjetos de vidrio estéril para el transporte al laboratorio. Puede cortarse un pedazo de la cinta y echarse dentro de un tubo de caldo o colocarse sobre una placa de agar, o bien, teñirse directamente. Para evitar pérdida de la imagen debido a que las propiedades ópticas de la cinta celofán son-

inferiores a las del vidrio, se sujeta la cinta con la parte adhesiva hacia arriba en un portaobjetos, se pone una gota de lactófenol y luego se coloca el cubreobjetos. La cinta de celofán puede ser cinta Scotch.

## 6. MÉTODOS DE CÁMARAS DE PERFUSIÓN.-

Las cámaras de perfusión pueden definirse como métodos de microcultivo en los cuales el nutriente se suministra en una solución que puede cambiarse, ya sea in termi tamente o cont ínua mente, por un sistema de flu jo.

A pesar de que la mayoría de estas técnicas fueron diseñadas para el cultivo de células animales, muchas son igualmente aplicables para el cultivo de muchas cla ses de microorganismos que tienden a adherirse a superficies sólidas. Somerson se dió cuenta de que Mycoplas ma se adhiere a superficies de vidrio bajo ciertas condiciones de cultivo por lo que esos microorganismos pue den ser tratados de igual forma que los cultivos de te jid os. Así mismo, se ha observado una tendencia de muchos otros microorganismos a adherirse a superficies de vidrio; las bacterias superiores, en particular, son dó ciles para el estudio en cámaras de perfusión.

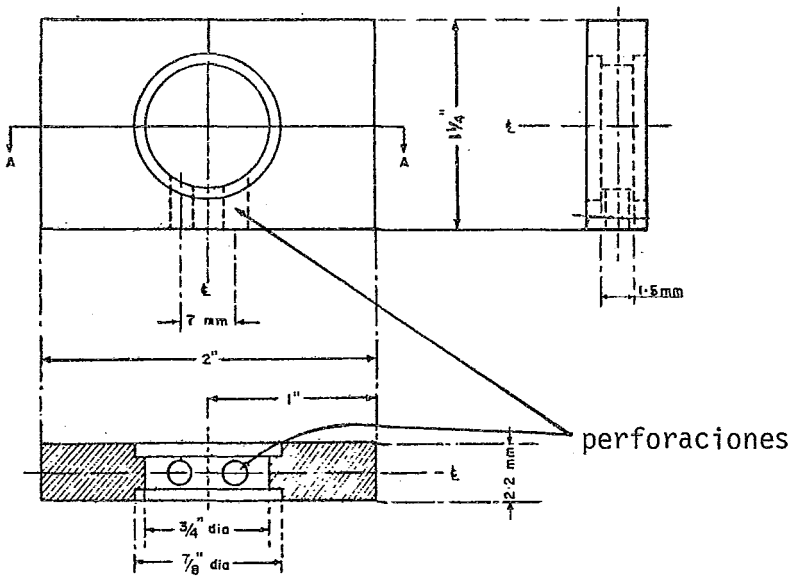
En muchas ocasiones se han utilizado las cámaras de perfusión para estudiar los efectos de algunos com pu estos químicos sobre las células.

## 6.1 CAMARAS QUE PERMITEN EL CAMBIO INTERMITENTE DE MEDIO

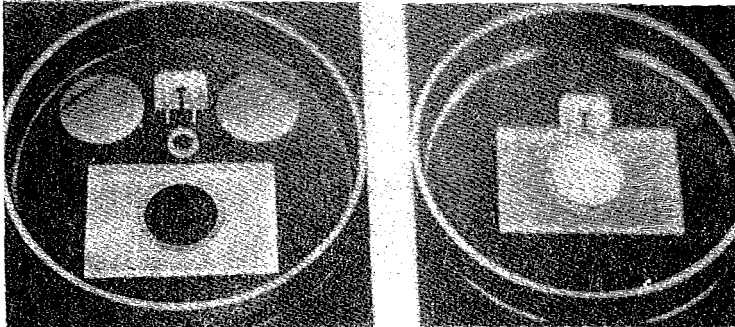
### 6.1.1 Cámara de Mackaness. -

Mackaness diseñó una cámara que permite la observación de una población de macrófagos; el medio puede cambiarse sin pérdida de células y pueden hacerse fácilmente preparaciones teñidas permanentemente.

La cámara consta de una pieza de Perspex de 2 x 1 1/4 pulgadas con 2.2 mm de espesor, a la cual se le hace un orificio central de 12 mm de diámetro. La superficie de cada lado de la apertura es ensanchada y avellanada a un espesor de 0.35 mm para poder ajustar cubreobjetos estándar de 7/8 de pulgada, dejando entre los dos cubreobjetos un espacio de 1.5 mm; después se fija un anillo pequeño de Perspex de 6 mm de diámetro al cubreobjetos del fondo con parafina (punto de fusión de 56 °C). Se hacen otras dos perforaciones en el lado que se comunica con la cámara, las cuales son tapadas con dos alfileres de acero inoxidable dentro de una cuña del Perspex.



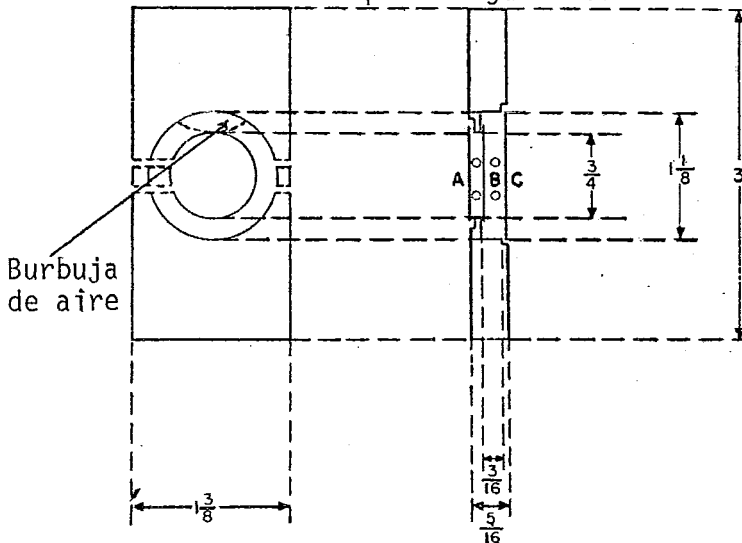
En este esquema se muestran los detalles de la construcción de la cámara de Mackness.



A la izquierda se observan los componentes de la cámara de Mackness, y a la derecha se encuentra ya armada.

### 6.1.2 Cámara de Harris.

Harris modificó la cámara de Mackaness para permitir una oxigenación adecuada de -- las células durante varios días. Se trata -- de una cámara con dos estratos, la cual invo -- lucra el uso de 3 cubreobjetos. Las medidas se observan en el esquema siguiente:



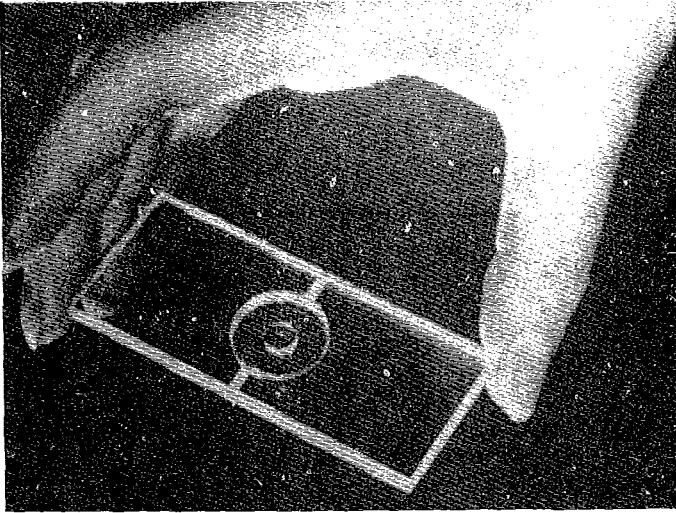
La suspensión celular se introduce dentro de un compartimiento, el más bajo, formado por A y B; entonces las células se asientan y se adhieren a A. Después se cambia el medio, se quita el cubreobjetos B y se sella el cubreobjetos C. Se introduce más medio de cultivo a través de los hoyos perforados hasta que se llene la cavidad de la cámara -- excepto por una burbuja de aire, grande, que

se deja. Esta es de tal medida que no debe permitir la invasión sobre el cubreobjetos-A. La burbuja de aire es de 95% de  $O_2$  y 5% de  $CO_2$ ; se sellan los hoyos perforados. La cámara se une a una placa giratoria la cual se coloca a 1 rpm, haciendo que la burbuja dé vueltas en redondo.

### 6.1.3 Cámara de Pulvertaft.-

El construyó una cámara simple de un portaobjetos de Perspex, al cual le hizo un foso de 3 mm de espesor en una de las superficies, dejando un pilar central de 6 mm de diámetro. Se perforaron dos canales de un extremo a otro del portaobjetos conectados con el foso, como se observa en la página siguiente.

Las células para el cultivo deben colocarse directamente sobre el pilar central, en una forma de cultivo fluido. Se aplica un cubreobjetos el cual se sella con parafina.



Uno de los canales laterales se tapa con una tirita de madera impregnada con cera y el foso se llena con medio de cultivo. Después se tapa el otro canal, cuando el foso está lleno a la mitad de su capacidad. - Los cultivos pueden alimentarse en cualquier momento, quitando los tapones de los canales y sacando por un lado el medio viejo.

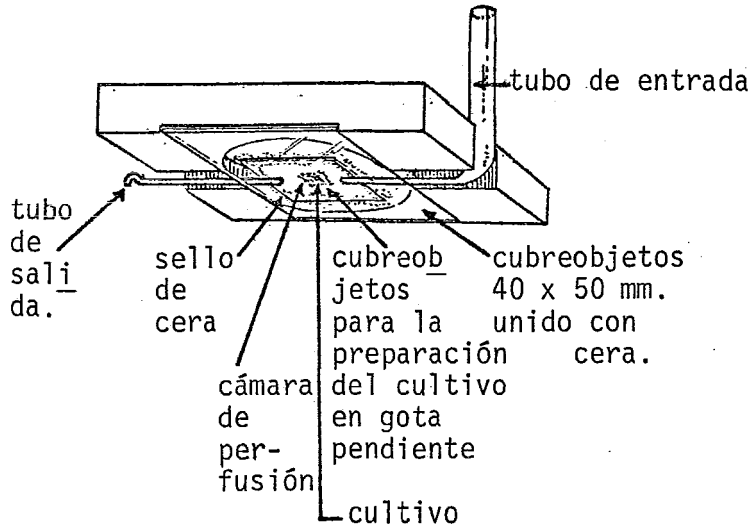
## 6.2 CAMARAS DISEÑADAS PARA UNA PERFUSION CONTINUA.-

### 6.2.1 Cámara de Pomerat.-

Pomerat describió una cámara bastante simple que consiste en dos cubreobjetos sellados juntos con cera, dejando un espacio



pequeño entre ellos. La perfusión se hace sellando dos tubos delgados que -- sirven como conductos de entrada y salida, colocados en lados opuestos. El cubreobjetos del fondo es considerablemente más largo y la parte que sobra se fija con pegamento a la base de un bloque de acero inoxidable para dar mayor rigidez y facilitar su manejo.



Perspectiva de la cámara de Pomerat armada.

Esta cámara se ha usado en estudios del efecto del  $^{32}\text{P}$  sobre las células vi-

vientes de la epidermis humana adulta.

#### 6.2.2 Cámara de Rose.-

Una cámara laminada con cinco capas fué descrita por Rose. Las capas constan de una placa de acero, cubreobjetos, empaques de goma, cubreobjetos y placa de acero. Esta cámara puede armarse y esterilizarse para tenerla así almacenada y lista para su uso.

Tiene dos placas de acero inoxidable de 2 x 3 x 1/8 pulgadas, cada una con un orificio central de 1 1/16 pulgadas de diámetro, biselado a un ángulo de 45°. Cada placa tiene 4 orificios y la de arriba tiene un hueco para adaptar la cabeza de los tornillos planos, que se atornillan dentro de los orificios de la placa del fondo. El centro de la cámara está hecho de goma látex de 2 x 1 3/4 x 1/8 de pulgada, con un orificio central. Cuando está armada la cámara, las placas de acero presan dos cubreobjetos de 50 x 43 mm sobre las superficies externas de la pieza central de látex. El apretado final de los tornillos debe hacerse después de la inserción de una aguja No. 25 de 1/2 pulgada a través del borde del

empaque de látex, para permitir el equilibrio de la presión de la cámara. La inoculación de la cámara ya armada puede hacerse inyectando a través del empaque; alternadamente se coloca la célula en la cámara armada inyectándola, pero si la muestra es demasiado grande como para pasar por la aguja es preferible colocarla dentro de la cámara antes de colocar el cubreobjetos superior y después se arma. Esta cámara puede estar unida a frascos de suministros con pocas agujas las cuales se unen después a tubos.

La construcción simple de la cámara de Rose, así como su fácil manejo han hecho muy popular este diseño.

### 6.2.3 Cámara de Sykes y Moore.-

Esta cámara consiste básicamente en 2 anillos de metal que engranan al atornillarse. Cuando se atornillan juntos ellos comprimen un anillo de silicón entre dos cubreobjetos, como en la cámara de Rose. El empaque puede ser atravesado. El diámetro del exterior del anillo de goma y de los cubreobjetos es de 25 mm. Su uso es similar al del método de Rose.

#### 6.2.4 Cámara de Barski y Robineaux.-

También es muy similar a la de Rose, - pero en lugar de tener una parte interior de goma la tiene de araldita. Los tubos de entrada y salida son tubos perforados de acero inoxidable, delgados, que se encajan en la araldita. El sello entre la parte interna de la araldita y los cubreobjetos se hace -- con vaselina.

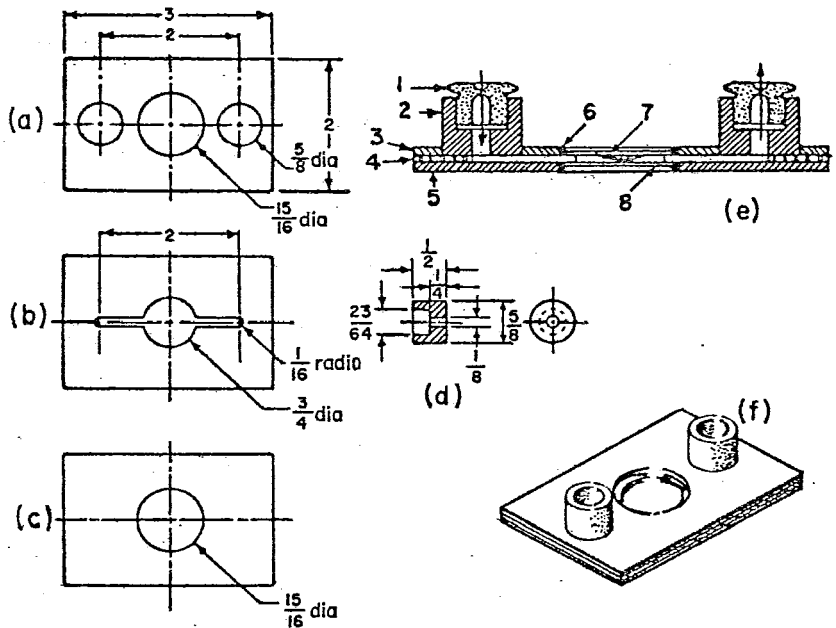
#### 6.2.5 Cámara de Toy y Bardawil.-

Toy y Bardawil establecieron los seis requerimientos mínimos para una cámara de -- perfusión apropiada, que son:

- Diseño simple y fabricación barata.
- Facilidad para cargarla rápidamente con un personal experto.
- Facilidad para cambiar el medio.
- Que esté libre de contaminación y - no sea tóxica.
- Facilidad para observación microscópica y fotografía.
- Facilidad para desmontarla, así como para limpiarla y esterilizarla.

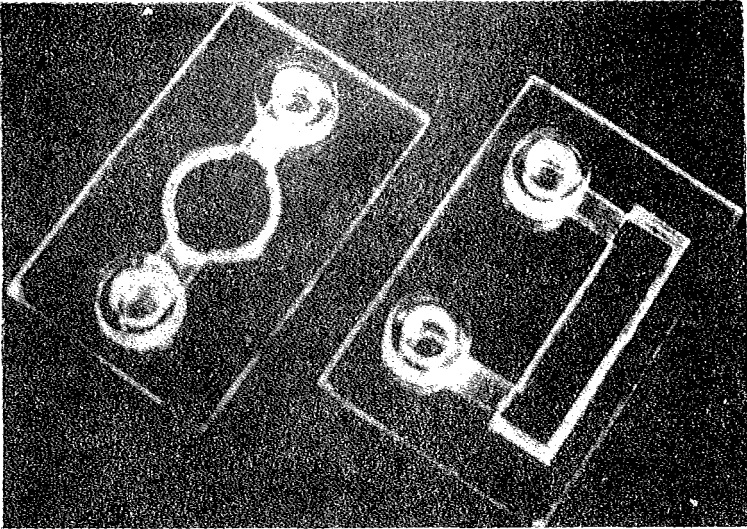
Esta cámara consiste de tres piezas: -  
(a) es una placa para cubrir, con aperturas para la ventana superior y para dos tubos a

través de los cuales es perfundido el medio. (b) es una placa en la parte interna que sirve como soporte para el cubreobjetos. (c) es una placa que sirve de fondo con una - - apertura para la ventana inferior. Los tubos se pegan con cemento y las ventanas de - cubreobjetos se fijan en su lugar con una -- mezcla de parafina y cera de abejas.



Cámara de Toy y Bardawil. (a) placa que cubre. (b) placa central. (c) placa del fondo. (d) conducto. (e) cámara armada, (1, tapón de goma; 2, conducto; 3, placa (a); 4, placa (b), 5, placa (c); 6, sello de cera; 7, células; 8, cubreobjetos) y (f) - - perspectiva de la cámara. Las dimensiones - están en pulgadas.

Se han dado dos variaciones del diseño básico, las cuales se muestran a continuación:



Cámaras de Toy y Bardawil. La de la izquierda fué diseñada para cubreobjetos de  $7/8$  pulgadas; y la de la derecha para cubreobjetos de  $11 \times 50$  mm.

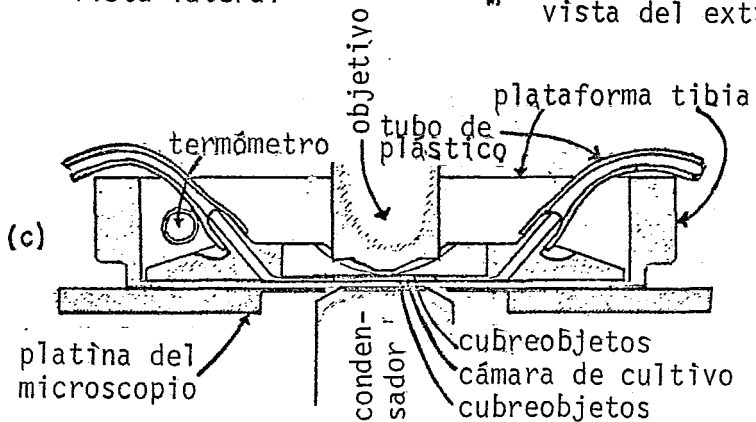
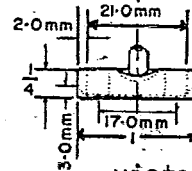
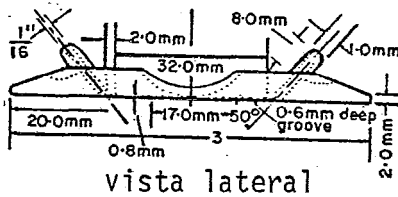
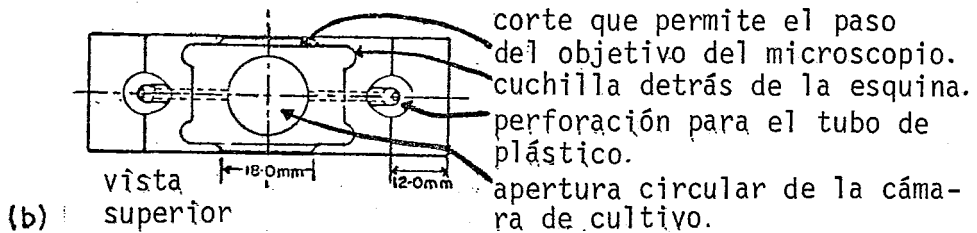
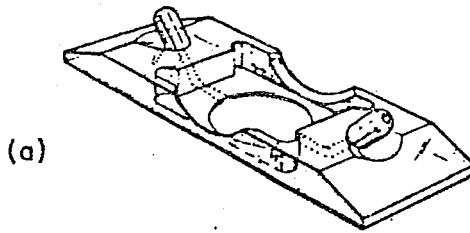
El inóculo se coloca sobre cualquiera de las ventanas de la cámara según lo requiera la microscopía.

Las capas de la cámara están hechas de plexiglas y las superficies se pegan juntas aplicándoles primero etileno diclorado para

formar una película superficial de plexiglas parcialmente disuelto; después las partes - (a), (b) y (c) se sujetan juntas bajo presión. Después de pocos minutos, los dos tubos deben pegarse a la armadura. El solvente superfluo se volatiliza en la incubadora. La esterilización se hace con rayos X o ultravioleta.

#### 6.2.6 Cámara de Christiansen.-

Esta cámara fué diseñada para usarse con una incubadora; puede ser de plástico o de vidrio. La cámara de plástico se construye de una hoja de plástico acrílico de 1/4 de pulgada, plexiglas, con las dimensiones que se muestran en el siguiente esquema:



Cámara de Christiansen. (a) perspectiva; (b) dibujos generales; (c) corte de la cámara ya armada y puesta en el microscopio.



Se graban dos ranuras sobre el lado de arriba del bloque, extendiéndose de la apertura circular a 20 mm de cada extremo del -- bloque. En esos puntos, cada ranura se une a una perforación de 1/16 de pulgada hacia -- arriba y hacia afuera a través del bloque. -- Se pegan dos canales de desagüe en la parte superior. El fondo de la cámara se forma -- uniendo un cubreobjetos delgado a la base, -- con lo cual quedan encerradas las ranuras y los orificios del bloque de plástico. El -- cultivo se adhiere al cubreobjetos superior, el cual cubre la apertura circular entera.

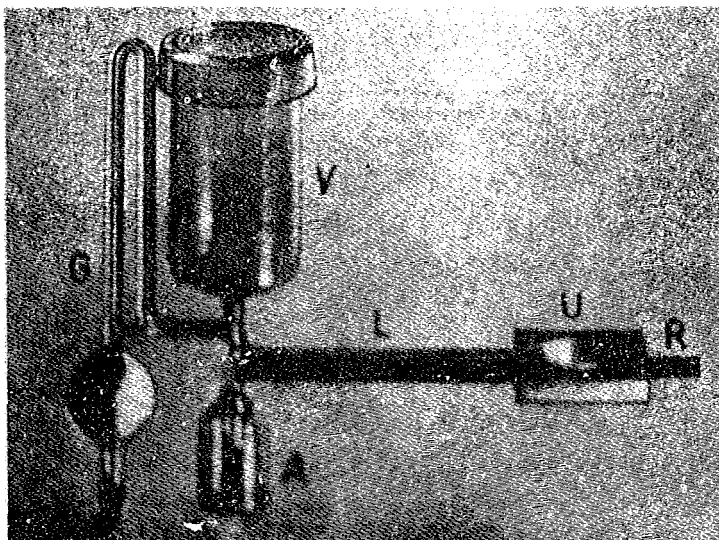
Una cámara de vidrio del mismo diseño puede hacerse esmerilando los hoyos y ranu-- ras en un portaobjetos de 1 mm de espesor. -- Los tubos de entrada y salida se colocan en bloques de vidrio más delgados. La cámara -- de vidrio puede esterilizarse en autoclave, -- mientras que la de plástico requiere de ra-- yos ultravioleta.

#### 6.2.7 Cámara de Schwöbel. -

Schwöbel, describió una cámara de per-- fusión de acero inoxidable y un sistema re-- servorio de medio que utilizó para el estu-- dio de células de tejidos. Se hizo un apar-- ato de vidrio con el mismo diseño básico. La

versión de este esquema consiste esencialmente de una cámara de cultivo (U), formada por dos cubreobjetos sellados a la cima y al fondo de una sección de tubo de vidrio de 30 mm de diámetro. El espacio entre los dos cubreobjetos es empacado con fibra sintética. -- Dentro de la pared de la cámara sobre un lado, está unido un tubo de 4 mm de diámetro, (R) por el cual puede introducirse la muestra; además están opuestos dos tubos más pequeños (L) de 1.5 mm de diámetro que sirven para entrada y salida de medio del reservorio (V).

La velocidad de flujo del medio, está determinada por la velocidad a la cual se permite que el gas sea colectado en el reservorio, y ésto se controla por una pinza de presión simple en la línea de gas (G). El medio que sale puede colectarse bajo la campana de vidrio (A).

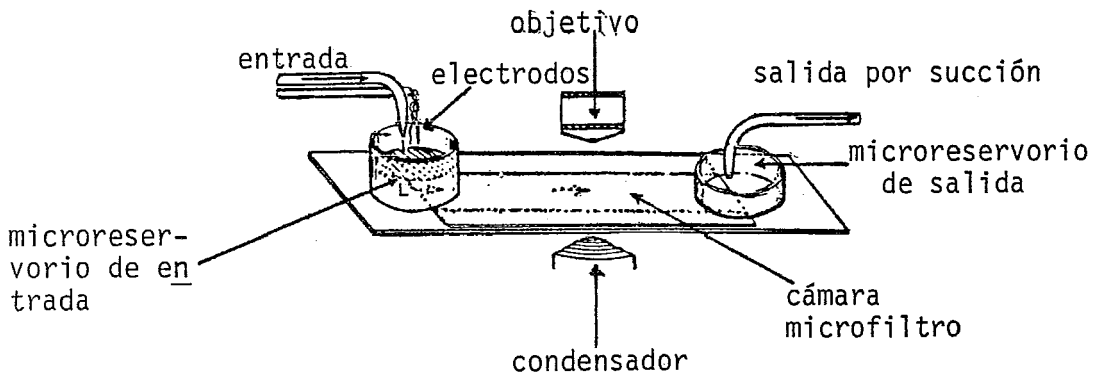


Cámara de Schwöbel y sistema de suministro de medio. U, cámara de cultivo; R, tubo para introducir muestra; L, tubos de flujo de medio; V, reservorio de medio; G, tubo de entrada de gas con filtro; A, campana de vidrio protegiendo el extremo del tubo de flujo de salida de medio.

#### 6.2.8 Cámara de Ware y Loveless.-

Ware y Loveless diseñaron para la elaboración de una película biológica en un filtrado de aguas sucias, una cámara de perfusión en la cual se permite que los organis-

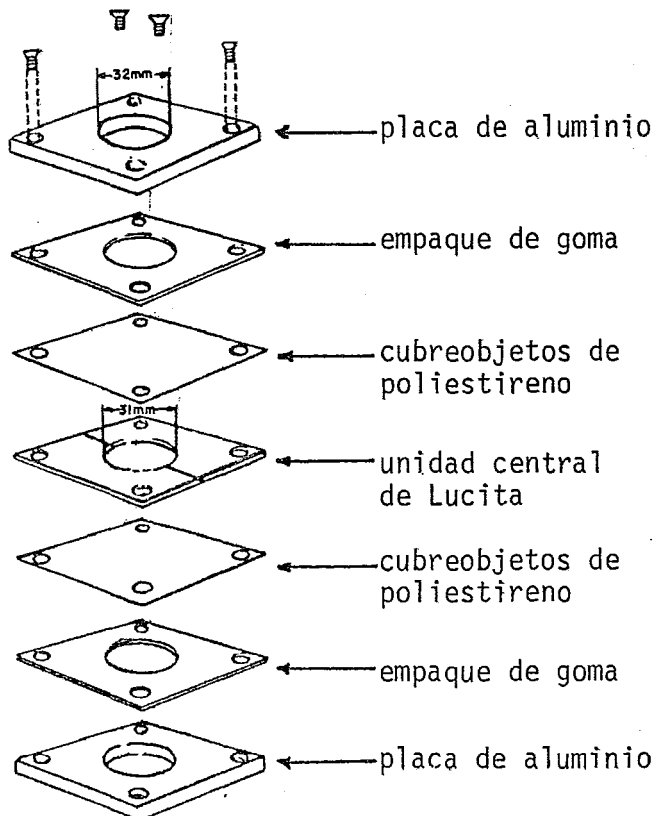
mos fluyan a través de un canal poco profundo formado por un portaobjetos y un cubreobjetos. Este "microfiltro" fué construido - pegando dos tiras delgadas de vidrio a un - portaobjetos y poniendo un cubreobjetos como techo de la cámara. Se pegan anillos de vidrio sobre cada extremo para formar reser-  
vorios, para añadir y quitar el líquido de perfusión como se observa en la siguiente -  
figura:



La velocidad de flujo a través de la cámara, se determina por la capacidad de --  
fluído en el reservorio, la cual se contro-  
la por si misma mediante una válvula elec-  
tromagnética operada a través de un inte-  
rruptor, con electrodos en el reservorio. -  
Se coloca en un microscopio de contraste de  
fases.

### 6.2.9 Cámara de Thomas y Cramer.-

Esta cámara está formada por dos placas de aluminio de 1/8 de pulgada de grueso y 57 x 57 mm, atornilladas juntas, las cuales ejercen presión sobre empaques de goma que por sí mismos hacen presión sobre cubreobjetos de poliestireno. Estos últimos encierran una unidad central de lucita de -- 1/16 de pulgada de grueso, horadada para -- llevar dos agujas hipodérmicas como aperturas de entrada y salida de la cámara central.



El sistema consiste en una bomba que impulsa el aire ó  $\text{CO}_2$  a través de un filtro Swinney con una membrana Millipore, para dar un gas estéril, a un reservorio de medio encerrado y de este modo desplaza al medio, el cual fluye a la cámara de perfusión. Al ser controlable la velocidad de flujo del gas, también se controla el flujo del medio. El flujo de salida se recibe en tubos de salida estériles.

#### 6.2.10 Cámara de Carter.-

Carter diseñó una cámara simple y eficiente, la cual consiste en un anillo doble de acero inoxidable unido permanentemente a una placa base de vidrio con resina epoxy. Los dos anillos concéntricos están separados por un canal anular. Y antes de que se coloque el cubreobjetos, se aplica aceite de silicón pesado (viscosidad 10,000 cs) inyectándolo con jeringa al anillo de afuera. El cubreobjetos es cuadrado porque sus esquinas facilitan su colocación. Se ponen pinzas para oprimir al cubreobjetos firmemente contra el anillo interior. Una extensión corta de tubo de acero inoxidable da acceso a la cámara.

### 6.3 CAMARAS CON SOPORTE DE MEMBRANA CELULAR.-

El diseño de cámaras de perfusión para el estudio del crecimiento de bacterias gira alrededor del problema de un soporte adaptable para las células, ya que a veces la observación continua de células microbianas es casi imposible a menos que se utilice una forma de soporte para ellas.

#### 6.3.1 Cámara de Hartman.-

Describió una forma de convertir una rejilla para muestras de un microscopio -- electrónico en microcámaras múltiples, -- usando Formvar (polivinilo disuelto en etileno diclorado) como membrana de contención. Se sumerge la rejilla de muestras en una solución de Formvar al 0.2% en etileno diclorado, se reposa un instante en papel filtro y se coloca sobre un cubreobjetos. Después se coloca una gota de inóculo sobre la rejilla, quitando el exceso para que el nivel del fluido quede justo por debajo de la superficie de la rejilla. Si la superficie de la rejilla está mojada, la segunda membrana no se adhiere adecuadamente. El piso de la cámara se forma sumergiendo el cubreobjetos en una membrana previamente moldeada sobre vidrio y separada con agua. El cubreobjetos se in--

vierte después encima del pozo de un portaobjetos especial, y los bordes se sellan con cera, excepto en los canales laterales. El portaobjetos que se usa es el de Fisher Littman, el cual tiene un pozo plano. Los canales de entrada y salida están dentro de la superficie para comunicarse con el pozo.

Esta técnica de la rejilla, podría aplicarse fácilmente a una u otra de las cámaras de flujo, aunque existen varios problemas asociados con esta técnica: primero, se debe asegurar que el etileno diclorado no se quede en las membranas para que no esté en contacto con el inóculo; segundo, debe mostrarse que los solutos a ser perfundidos son capaces de pasar a través de una membrana plástica, para que así puedan estar en contacto con las células; tercero, existen deficiencias ópticas que resultan de la curvatura de las membranas Formvar. La curvatura de las membranas -- ejerce su acción como lentes que refractan la luz a menos que el medio que las rodea sea del mismo índice de refracción que la membrana.

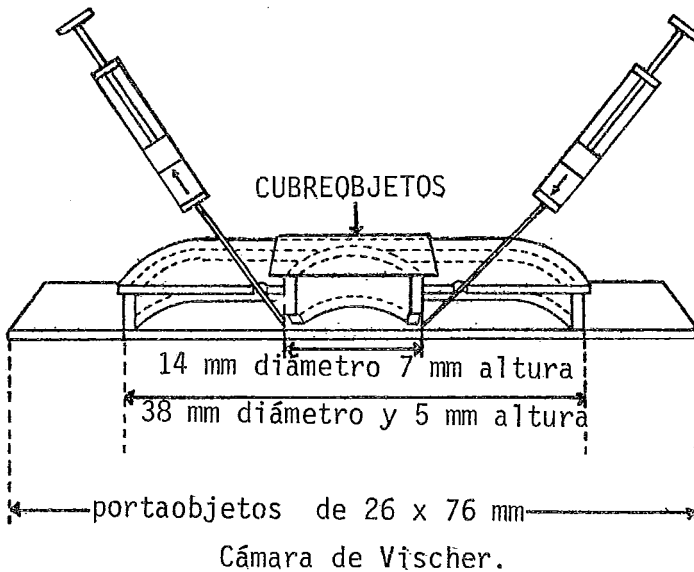
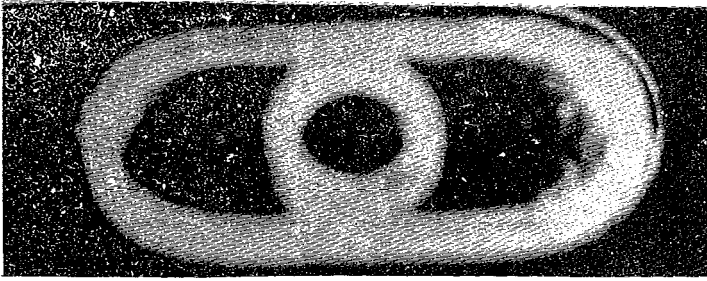
### 6.3.2 Cámara de Vischer.-

Vischer, diseñó una cámara de perfu-



sión hecha de plexiglas; ésta tenía un -- anillo interno, sobre del cual se colocaba el cubreobjetos que tenía el inóculo;-- el anillo se comunica con una cámara reservoria que lo rodea, como se observa en la figura de la página siguiente.

Las células son retenidas sobre el lado inferior del cubreobjetos con una -- membrana Formvar, ya que el inóculo celular se coloca sobre el cubreobjetos y se incubaba una hora para permitir que las células se adhirieran a la superficie del vidrio. Después se sumerge el cubreobjetos con células en una solución salina que -- tiene una membrana Formvar flotante en la superficie, se lleva hacia arriba el cubreobjetos para que el vidrio quede en -- vuelto con esa membrana, quedando atrapadas las células entre el cubreobjetos y -- la membrana.



Después se coloca la preparación sobre el anillo interno de la cámara, poniendo el lado de la membrana hacia abajo. Sin duda, este método es muy útil para las células de tejidos y para aplicarlo a bacterias debe tenerse cuidado de que no sean arrastradas al poner la membrana, por lo que este proceso debe hacerse rápidamente.

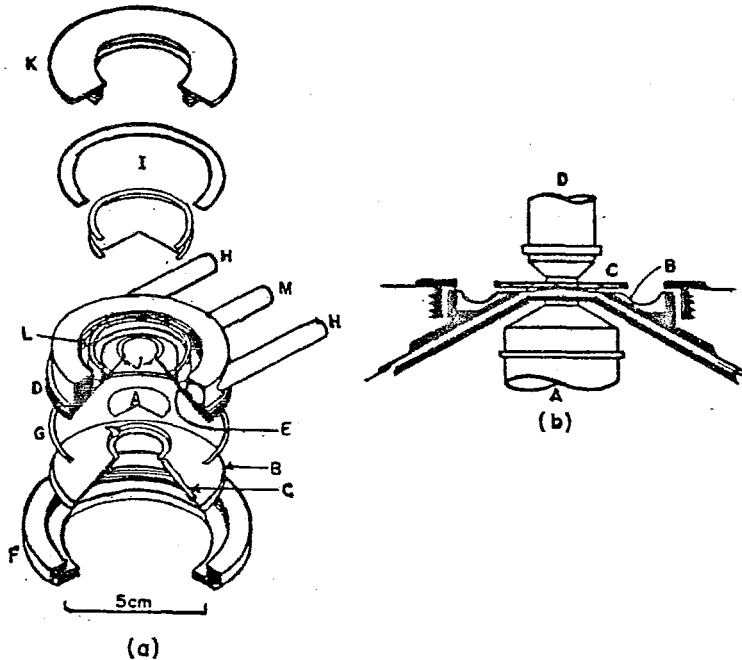
### 6.3.3 Cámara de Powell.-

En 1951, Harris y Powell, publicaron el diseño de una cámara, la cual utiliza una membrana de celulosa (celofán) como membrana semi-permeable de soporte para bacterias, en un sistema de flujo continuo. Los organismos apoyados sobre la superficie de la membrana son alimentados por debajo de la misma, y se utiliza iluminación vertical para la observación.

Powell, en 1956, reconoció serias limitaciones en esta cámara porque la iluminación vertical es inadecuada y provoca cierta evaporación en la superficie del celofán, originando cambios locales en las concentraciones de solutos disueltos. En la siguiente página se observa un modelo más sofisticado descrito por Powell en 1956; el diseño mecánico complicado de esta cámara está dictaminado por dos condiciones:

- 1 Debe ser lo suficientemente delgado para trabajar entre un condensador y un objetivo y permitir una apertura de iluminación adecuada.
- 2 La membrana de celofán debe es--

tar tensa y plana para prevenir -  
la distorsión del rayo de ilumina-  
ción de contraste de fases.



Cámara de Powell mejorada (1956). (a) proyección isométrica. (b) sección esquemática central con un condensador (A) y un objetivo de inmersión (D). (B) es la membrana de celofán y (C) un cubreobjetos.

Las partes componentes de la cámara - se muestran en la proyección isométrica (a) del esquema de esta página. El piso de la cámara está formado por un cubreobjetos (A)

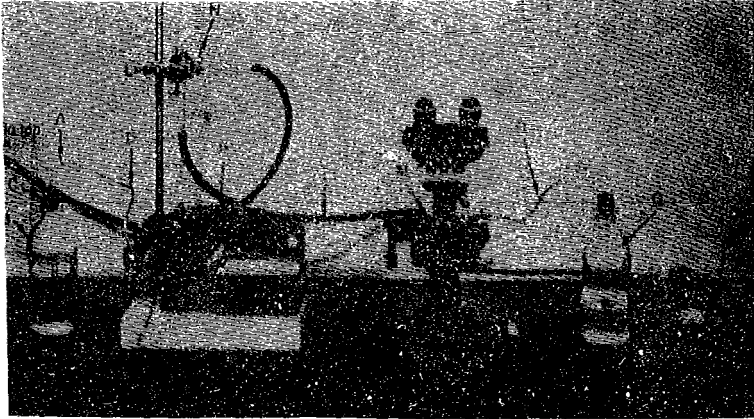
pegado con cemento dentro de un armazón cónico de acero inoxidable (B). En lados opuestos de la superficie externa del armazón, están los canales (C), a lo largo de los cuales fluye el medio dentro y fuera de la cámara. Este armazón está insertado por debajo dentro del cuerpo principal de la cámara (D), también de acero inoxidable de modo que los canales (C) están regulados con canales (E) en la superficie inferior del cuerpo. El armazón se mantiene en posición con un anillo que se cierra, la arandela angosta (G) se cierra en el hueco cuando el anillo para cerrar está apretado. En sus extremos inferiores, los canales (E) se comunican con tubos (H) para la conexión con la bomba para que circule el medio. Los lados y el piso de la cámara, tienen pasajes para el ingreso y egreso de líquidos. La cámara se cierra por una membrana de celofán (I) extendida sobre el cono (J); el volumen de trabajo es de 3 mm de espesor y 15 mm de diámetro. La membrana se sujeta entre las arandelas de polivinilo en su perímetro y por el anillo de cojinete (K) sobre la superficie (L). Esta superficie está sobre el mismo plano que la cara superior del cono (J). El hue

co anular entre (J) y (L) se conecta a una bomba de vacío por el tubo (M). El celofán se lleva hacia abajo dentro del hueco hasta que la tensión radial es aproximadamente uniforme y la superficie de la membrana (J) es tirante y bastante plana. El arreglo para estirar la membrana es necesario porque el celofán es muy elástico y se arruga instantáneamente sobre lo mojado. Una vez que ha sido estirado satisfactoriamente permanecerá así mientras no se permita que se seque. Los tubos de acero inoxidable (H) y (M) son soldados suavemente en el cuerpo.

Para operar esta cámara se requiere precaución y destreza. Powell describió una bomba que impulsa aire, construida de vidrio, para que el medio sea bien aireado.

a) Colocación de la cámara de Powell.-

Todas las piezas del aparato, que van a estar en contacto con la solución nutritiva, se esterilizan antes y se mantienen a la temperatura a la cual van a cultivarse los organismos de prueba.



La forma de usar la cámara de Powell se describe a continuación: El tubo de vidrio de flujo (A) se inserta en el cuello del frasco reservorio (B) y el tapón (C) se coloca en su lugar. La sección de goma (D) del tubo de flujo se sella en el lugar adecuado bajo los cilindros de presión (E) de la bomba (P). La cámara de cultivo se quita del recipiente en donde se mantenía estéril, después de haber estado en autoclave, y el tubo de goma (L) se conecta al conducto de vacío (M) de la cámara. La línea de vacío de goma (L) se conecta por una válvula a una bomba Geissler. Inserta das en la línea de vacío está una llave de vidrio con tres pasos, ligeramente engrasa da y capaz de regular efectivamente el nivel de presión en la línea (L).

b) Para montar la membrana.-

La línea de vacío (L) se bloquea

volteando la llave; un disco de celofán se coloca cuidadosamente con unos forceps, en el centro de la cima de la cámara. Se coloca inmediatamente la arandela sobre el disco y se fija apretando el tornillo para cerrar la cámara. En ese momento el disco de celofán debe estar sin arrugas, ya que lo arrugado indica una colocación incorrecta de la membrana. Si la colocación es correcta, se va abriendo la llave fraccionalmente hasta que la membrana quede tensa y estirada.

El motor de la bomba se conecta entonces sobre la bomba de medio, a lo largo del tubo de flujo, cuidando de que no se formen burbujas; para ello, se estira el tubo para que las burbujas suban al extremo abierto del tubo. Después el extremo abierto del tubo de flujo se conecta al tubo de metal para salida, mientras que el tubo de vidrio de salida se coloca en el frasco de salida (Q).

c) Para estirar la membrana.-

La bomba se pone a una velocidad de flujo de 100 ml/h y tan pronto como el medio que fluye dentro hace contacto con el celofán, se abre gradualmente la llave



durante 2 seg. Si esta operación está bien hecha, la flacidez de la membrana cuando está mojada se corrige y se nivela bajo la fuerza del vacío. Una vez que la membrana está estirada correctamente, permanecerá tensa a menos que se seque, o se interrumpa la línea de vacío. Se permite que el medio fluya lentamente bajo la membrana durante una media hora. La inoculación se lleva a cabo permitiendo que una gotita muy pequeña en una pipeta, toque la membrana. La pipeta no debe tocar la membrana porque se raya fácilmente. Se aplica un cubreobjetos con forceps, y se monta la cámara en la platina del microscopio.

#### 6.3.4 Cámara de Duxbury.-

Se ha visto que la cámara de Powell no tiene posibilidad de controlar la temperatura, y su construcción es complicada debido a su gran número de componentes, por lo que Isaac en 1975 describió una modificación de la cámara de Powell, en la cual se simplifica la construcción al reducir el número de componentes, pero tampoco puede controlarse la temperatura.

Más tarde, en 1977, Duxbury describió una nueva cámara en la cual el opera--

dor puede cambiar la temperatura, y la com  
posicion del medio de crecimiento con faci  
lidad.

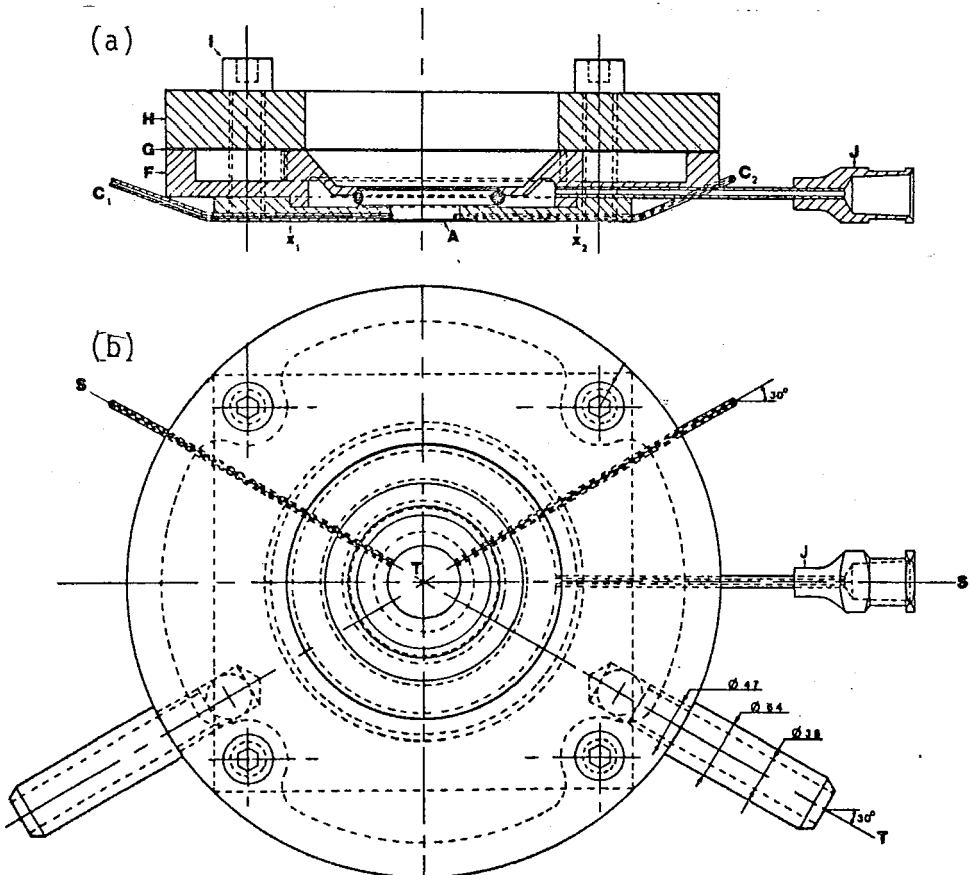
a) Construcción de la Cámara de Duxbury.-

La construcción de esta cámara, -  
se presenta en la figura de la página si-  
guiente. La base de la cámara (A) está --  
formada por un cubreobjetos estándar No.1,  
de 10 mm de diámetro el cual está pegado -  
con epoxy en una entrada que hay en el fon  
do de una placa base de acero inoxidable -  
(B).

Los tubos de entrada y salida de me-  
dio de cultivo ( $C_1$  y  $C_2$ ) son agujas hipo--  
démicas pegadas dentro de unas ranuras --  
que están dentro de la placa. La cámara -  
se cierra con una membrana de celofán, cir  
cular (D) sobre la cual se apoya un anillo  
de goma colocado centralmente. El compo--  
nente (F) también de acero inoxidable, se  
ajusta sobre (B), debe ser bien adaptado a  
 $X_1$  y  $X_2$  (pequeños rectángulos de goma) pa-  
ra asegurar la simetría concéntrica alrede  
dor del centro de la cámara. La cubierta  
de agua se cierra con una cobertura de - -  
perspex (H) y se sella con un empaque de -  
película (G). Cuatro tornillos (I) mantie

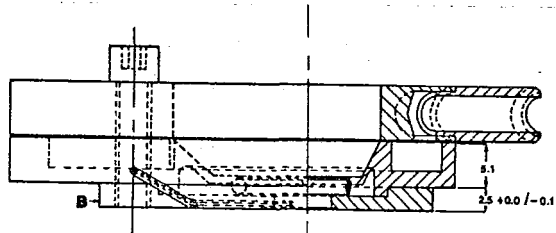
nen unidas las partes. Se incorpora un tubo de vacío (J) para estirar la membrana.

El diseño circular de la cámara permite que las tres secciones principales sean montadas en diferentes posiciones gracias a lo cual los tubos de entrada y salida, así como el de vacío, pueden acomodarse en diferentes formas.

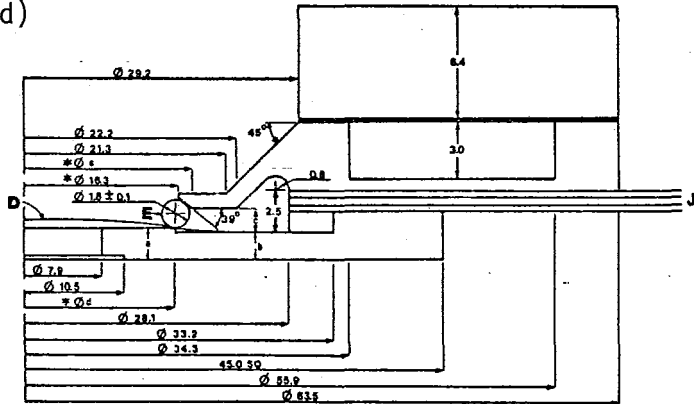


(a) sección frontal; (b) plano,

(c)



(d)



(c) mitad de la sección; (d) detalle -  
de la sec  
ción  
central.

Todas las partes que están en contacto con el medio de cultivo pueden ser esterilizadas por separado en el autoclave (121°C durante 15 minutos). La cámara en general mide - - 63.5 mm de diámetro x 14 mm de alto.

b) Operación de la cámara de Duxbury.-

b.1 Preparación de las membranas celofán:

El celofán comercial contiene plasticantes que pueden inhibir algunos microorganismos. Por lo que resulta aconsejable hervir los discos de celofán en agua destilada durante una hora para quitar esos compuestos.



Las membranas pueden meterse en -- autoclave (121°C/15 min), y luego se almacenan mojadas hasta que se requiera su uso.

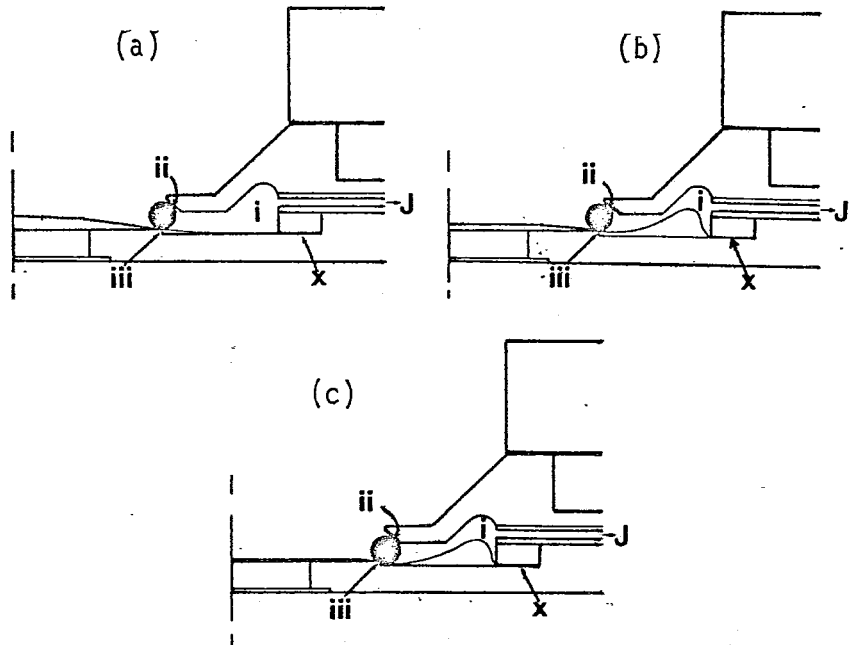
b.2 Para estirar la membrana y sellar la cámara:

Cuando se moja el celofán, se arruga instantáneamente por lo cual es necesario aplicar vacío para estirarlo de manera uniforme y lograr así una superficie plana, tal como en la cámara de Powell.

Los detalles de la inserción del -- tubo de vacío, así como las operaciones para estirar y sellar la --

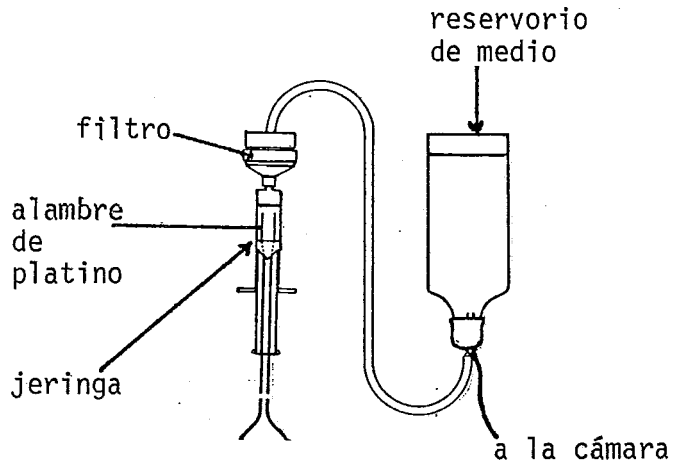
membrana, se muestran en la figura de la página siguiente.

Aplicando el vacío por (J), el celofán se une periféricamente a (X), y se arrastra dentro de la depresión anular (i) como se observa en el inciso b) de la figura. En esta etapa no hay presión sobre la membrana por parte del anillo y el celofán se desliza entre la placa base de metal y la goma. Debido a la compresión del anillo en la apertura entre (ii) e (iii), como se observa en el inciso c) de la figura, se desplaza el celofán creando un sello hermético en (iii) para la cámara. Los tubos de medio se unen a la cámara y después empieza el flujo de medio.



### b.3 Abastecimiento de medio:

Para reducir la flexibilidad de la membrana provocada por la presión del medio liberado con bombas peristálticas, se usa una bomba electro-lítica para impulsar el medio a la cámara. Una bomba conveniente de este tipo, puede construirse con una jeringa de plástico de 5 ml la cual se conecta al reservorio de medio a través de un filtro de membrana como se observa en la siguiente figura:



El flujo de medio es directamente proporcional a la cantidad de corriente que pasa a través del circuito cuando está regulada con un resistor de  $2\text{ K}\Omega$ . Usando electrodos de alambre de platino, de  $17\text{ mm}$  de largo y  $8\text{ mm}$  de lado, así como agua acidificada con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como electrolito, el medio fluye entre  $1.5\text{ ml/h}$  ( $5\text{ mA}$ ) y  $90\text{ ml/h}$  ( $150\text{ mA}$ ). Sin embargo, a altos valores de corriente (cerca de  $100\text{ mA}$ ) se genera un calentamiento considerable, que puede deformar el plástico; en tal caso, se puede substituir por



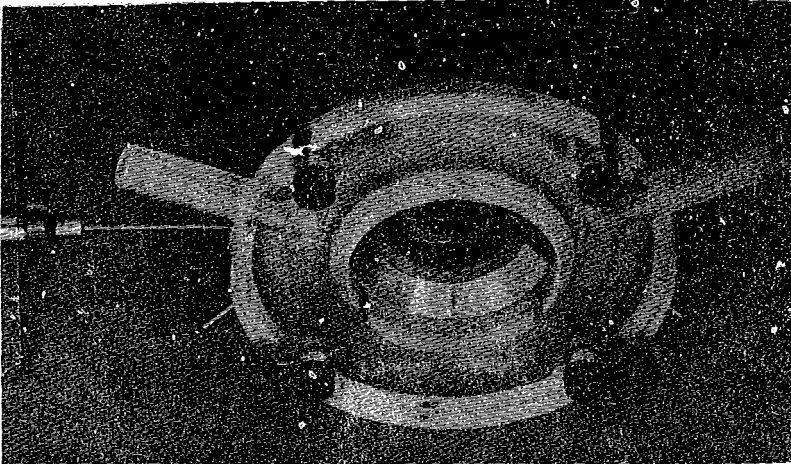
una jeringa de vidrio. La capacidad de la bomba depende del volumen de agua para la electrólisis. Aproximadamente 2 litros de gas se generan por cada ml de agua. Un medio alternativo puede pasarse a través de la cámara reconectando diferentes reservorios de medios.

#### b.4 Control de la temperatura:

El control de la temperatura se lleva a cabo usando una cobertura de agua conectada a un circulador de agua con temperatura controlada. Este método de control es barato, y permite al operador modificar la temperatura rápidamente durante un experimento, lo cual significa que los experimentos pueden llevarse a cabo en un laboratorio normal. Cuando la cámara se mantiene a baja temperatura (bajo 15°C) por períodos prolongados puede ocurrir una condensación o existir humedad atmosférica sobre los componentes metálicos, pero esto puede quitarse con papel filtro de vez en cuando.

### b.5 Inoculación:

La membrana se inocula con la suspensión de bacterias deseada, usando una varilla de vidrio estéril, para reducir el riesgo de pinchar la membrana. Después se cubre la muestra con un cubreobjetos estéril de 10 mm de diámetro



Cámara de Duxbury armada.

### b.6 Observación:

Se utiliza un microscopio de contraste de fases. Se pueden usar objetivos de inmersión.

Esta cámara se utilizó para observar el desarrollo de *Arthrobacter globiformis* en 10 horas; y después se le cambiaba el medio por uno que tenía caldo nutritivo pero con penicilina, para ver el efecto de la penicilina en las células.

## 7. MÉTODOS DE PLACAS PEQUEÑAS EN PORTAOBJETOS.-

### 7.1 PARA CONTEO Y LOCALIZACIÓN DE MICROORGANISMOS -- VIABLES.-

#### 7.1.1 Método de Frost.-

Frost propuso que el examen bacteriológico de la leche podía efectuarse en un tiempo más corto si se ponía ésta sobre un portaobjetos en lugar de inocularla en cajas petri, siendo que en pocas horas podían contarse las microcolonias formadas sobre los portaobjetos.

En el proceso de Frost, se pone 0.1 ml de leche en agar nutritivo y se esparce esta mezcla sobre un área de  $4 \text{ cm}^2$  en un portaobjetos; luego se incuba de 3 a 8 horas en una cámara húmeda, se deja secar al aire y se fija a la flama para después poder teñirlo y efectuar la cuenta.

Para llevar a cabo la tinción, se colocan los portaobjetos dentro de una solución al 10% de ácido acético glacial en etanol al 95% durante un minuto para prevenir que el fondo tome una coloración espesa; se tiñen en azul de metileno (1:4) durante 3 minutos y se decoloran con etanol al 95% durante pocos segundos; se dejan secar al ai-

re. También puede hacerse una tinción de - gram.

A este método se le han hecho varias modificaciones para efectuar cuentas de bac<sup>u</sup>terias del agua, helados y mantequilla, así como de levaduras y mohos de la mantequilla.

#### 7.1.2 Método de Estabrooks y Bollen.-

Ellos usan un portaobjetos especial - que tiene una porción central elevada para soportar el cultivo mezclado con medio de - cultivo en un área definida. Con este método se reduce la pérdida de la película de - agar durante el teñido y el lavado.

#### 7.1.3 Método de Van Oijen.-

En este método se colocan con una pipeta capilar 0.05 ml de leche sobre el portaobjetos; se incuba 16 horas a 28 °C y se cubren después con un cubreobjetos cuadriculado para poder contar las colonias bajo un objetivo 40X.

#### 7.1.4 Método de Rowell.-

Rowell hizo otra modificación del mé-

todo de Frost, para determinar el número de organismos viables en el jugo de naranja; para ello, se coloca un portaobjetos estéril sobre la superficie de una capa de agar estéril contenida en una caja petri. Después se vierte una capa delgada de agar inoculado sobre la placa, la cual permanece húmeda por la profundidad del agar. Luego se incuba y se corta esa capa, se seca y se tiñe para contar las colonias.

#### 7.1.5 Método de Malecki.-

El método de Malecki consiste en esparcir agar en tres áreas circulares de  $1 \text{ cm}^2$  en un portaobjetos; se deja solidificar el agar y se le ponen después, en dos de esas áreas, 0.03 ml del material por analizar y en el tercer círculo se pone líquido solo, estéril, para que sirva de control. Después de incubar de 4 a 8 horas, se tiñe de igual forma que en el método de Frost.

Se han hecho comparaciones entre los métodos de placa pequeña y los métodos de placas estándar, observándose muchas ventajas en las microplacas, tales como que el método es muy rápido, simple,

ya que sólo se necesita material de vidrio y medio de cultivo; las placas se pueden guardar fijadas permanentemente, la cuenta de microorganismos concuerda con la técnica estándar. Sin embargo, muchos investigadores han considerado que este método por ser microscópico resulta molesto y pesado para el personal del laboratorio en exámenes de rutina, además de que requiere de una mayor habilidad para efectuar las cuentas. Es por eso, que Humphries inventó un equipo para contar automáticamente las microcolonias; consiste de una pieza ocular que cuenta más de 1000 objetos por hora mediante dos contadores electrónicos; uno que registra la medida del objeto y otro que registra el número contado.

#### 7.1.6 Método de Postgate y Cook.

Se coloca sobre un portaobjetos un anillo de metal de 20 mm de diámetro y 1 mm de espesor. Adentro se le vierte agar fundido, el cual después se inocula con un volumen conocido de la muestra; se coloca un cubreobjetos para cerrar el anillo y se incuba. Debido a que se conocen el área de la superficie del agar, el área

del campo microscópico y los factores de dilución, se puede calcular el número o el porcentaje de bacterias viables por campo, que son aquellas que forman microcolonias.

#### 7.1.7 Método de Taubeneck.-

En este método, se esparce una película Formvar sobre un portaobjetos que tiene un enrejado; al retirar la película, ésta conserva marcada la cuadrícula del portaobjetos. Después se adhiere la película a un cubreobjetos el cual se coloca sobre superficies de agar inoculado que están en portaobjetos, de esta manera resulta más fácil la localización de las colonias.

#### 7.1.8. Método de Hort.-

Hort propuso el uso de cubreobjetos estériles que tienen anillos diminutos cortados con diamante, luego se pone un cultivo diluido en el centro de cada anillo; se coloca el cubreobjetos sobre una película de agar en un portaobjetos y se examina el contenido de cada anillo.



## 7.2 PARA DETERMINAR LAS PROPIEDADES FISIOLÓGICAS DE MICROORGANISMOS.-

Engelbrecht, se dió cuenta de la utilidad - del cultivo en microplaca para la determinación rápida de las actividades fisiológicas de las bacterias y Hartman efectuó las pruebas de indol, rojo de metilo y Voges Proskauer en placas pequeñas. -- Por ejemplo, en la prueba del indol en agar-triptona al 1%, los resultados positivos aparecieron en 1 1/2 a 4 horas, mientras que en el método estándar con caldo triptona al 1%, se necesitan de 5 a 12 horas. De igual manera, una prueba de reducción de nitratos en placa pequeña, con  $\text{KNO}_3$  al 0.2% en el agar da resultados positivos en 1 1/2 a 15 - horas; mientras que en el método estándar usando -  $\text{KNO}_3$  al 0.1% en caldo se requieren de 4 a 20 horas de incubación.

La producción de ácido y gas por las bacterias, fué observada por Bronfenbrenner y Schlesinger en placas pequeñas. La cavidad de un portaobjetos excavado estéril, se llena con agar conteniendo el carbohidrato de prueba y un indicador de pH; y se cubre la preparación con un cubreobjetos estéril; se incuba y se observa la producción de - ácido y gas.

Los procedimientos generales para casi todas las pruebas de placa pequeña fueron esencial--

mente idénticos: se funden tubos con medio de cultivo y se mantienen a 45°C. Los portaobjetos ya limpios se almacenan en etanol al 95%. Para preparar la placa pequeña se saca el portaobjetos del etanol, se drena el exceso de alcohol, se flamea el portaobjetos y se pone sobre una placa tibia.-- Se ponen de una a ocho gotas de medio sobre el portaobjetos, se deja que el agar se ponga semi-sólido y después se coloca en el agar una asada de caldo de cultivo de 6 a 24 hrs. Después, la preparación se coloca en una cámara húmeda para meterla a la incubadora.

### 7.3 OTRA TECNICA DE CULTIVO EN PORTAOBJETOS.-

#### 7.3.1 Método de Hort.-

Se vierte agar muy caliente sobre un portaobjetos colocado en una caja petri, a fin de obtener una capa delgada, la cual se deja solidificar, y después sobre la película de agar se pone cultivo líquido diluido, encima se coloca una pieza de celuloide perforado, estéril, y encima de ésta, un cubreobjetos estéril. Cada perforación viene a ser una cámara húmeda diminuta. Este método sirve para aislamientos de células individuales.

Los métodos de placa pequeña, ofrecen ciertas ventajas en la identificación de cultivos, ya que permiten grandes ahorros:

- del 20 al 50% en el tiempo de incubación;
- un 50% en el tiempo de preparación;
- un 25% en el espacio de mesa de trabajo;
- un 75% en la cristalería necesaria;
- un 50% en el espacio de incubadora requerido;
- un 75% en los reactivos para efectuar las pruebas.

Además se puede hacer una deshidratación para conservarlos permanentemente.

## 8. MÉTODOS DE CULTIVO SOBRE MATERIALES INERTES DIFERENTES AL VIDRIO.-

Como ya se mencionó, los métodos de impronta consisten en que los microorganismos se adhieran a algún objeto inerte para que después puedan ser estudiados; en esta sección trataremos este tipo de métodos pero en materiales inertes, diferentes al vidrio.

### 8.1 CULTIVO SOBRE CELOFAN Y OTRAS MEMBRANAS.-

#### 8.1.1 Método de Fleming y Smith.-

Estos autores observaron que si se ponen discos de celofán sobre la superficie de un medio de cultivo sólido, se difunden a través del celofán los elementos necesarios para el crecimiento de microorganismos, los cuales crecen sobre la superficie del disco. Después, cuando ya existe crecimiento, se quita el disco del medio de cultivo, se esteriliza con vapor de formalina y se monta para preservarlo permanentemente. Este método se aplica al estudio de la germinación de esporas fúngicas, especialmente. Tales técnicas, usando celofán y otras membranas, también son aplicables para el estudio de propiedades morfológicas de bacte-

rias en general (Reed y McKercher), actinomicetos (Hopwood) y mixomicetos (Daniel y Baldwin).

#### 8.1.2 Método de Hillier.-

Hillier creció los microorganismos directamente sobre membranas de colodión, las cuales se colocan sobre medio sólido o flotando en medio líquido.

#### 8.1.3 Método de van Iterson y Ruys.-

Ellos crecieron Mycoplasma sobre membranas de colodión colocadas sobre una superficie de agar-triptona; las trazas de grasa del agar-triptona se quitan con éter de petróleo, y después se vierte sobre la superficie de agar una solución de colodión al 0.5% en acetato de amilo para formar la membrana.

Las membranas de nylon y ésteres de celulosa son menos satisfactorias que las de celofán, porque esas membranas no permiten el paso del medio a menos que haya líquido en ambos lados.

### 8.2 FILTROS DE MEMBRANA.-

El procedimiento de filtros de membrana pa-

ra el cultivo de microorganismos, es una técnica - aceptada generalmente.

### 8.2.1 Método de Funder y Johannessen.-

Estos autores cultivaron al microor-- ganismo sobre un filtro puesto en contacto con una superficie con nutrientes; después se quita el filtro, se seca y se tiñe la -- preparación para hacer la observación mi-- croscópica.

Este método, se emplea especialmente para determinar bacterias en el agua de mar. Es importante hacer notar que aunque el - - agua y otros líquidos son fácilmente filtra bles, existen otros que no lo son, y que ac túan como moléculas grandes, tal es el caso de la leche, la albúmina de huevo y el espu to; por lo que para resolver este problema, se diluyen antes de filtrarlos, o se les -- adiciona un surfactante y se filtran a 45°C obteniéndose una buena recuperación de bac terias.

## 8.3 ENTIERRO EN EL SUELO.-

### 8.3.1 Método de Cholodny.-

Como ya se mencionó en el capítulo de

métodos de impronta, Cholodny enterró pedazos de papel filtro unidos a portaobjetos - de vidrio para estudiar los efectos de enriquecimiento sobre la flora del suelo.

#### 8.3.2 Método de Kuzniar.-

Kuzniar, colocó pedazos de papel filtro de peso conocido sobre placas de vidrio y enterró las placas por un año para determinar la cantidad de celulosa descompuesta.

#### 8.3.3 Método de Tribe.-

Tribe combinó las técnicas de cultivo en celofán y entierro en el suelo. Su método consiste en lavar pequeños pedazos de celofán que se colocan sobre cubreobjetos y después se entierran. Los cubreobjetos se usan para localizar la preparación ya que ésta permanece en el suelo por varias semanas. También propuso un "sandwich" de 3 capas de celofán que se entierra en el suelo; al sacarlo se quitan después las dos capas externas del celofán y se deja la central - que es la que contiene el micelio de hongos.

#### 8.4 CULTIVO EN SACOS DE DIALISIS Y BOLSAS DE PLASTICO.-

El cultivo de microorganismos en sacos de -

membranas permeables es importante porque pueden observarse interacciones entre dos organismos, o bien pueden obtenerse condiciones anaeróbicas. -- Posteriormente, en el capítulo de métodos de cultivo "in vivo", se nombrará un experimento importante hecho por Metchnikoff en donde se usaron sacos de colodión de 3-4 ml de capacidad (capítulo 20.)

#### 8.4.1 Método de Freter.-

Freter estudiando los antagonismos bacterianos, cultivó una cepa en una bolsa de diálisis suspendida en medio de cultivo, después quitó la bolsa e inoculó el medio gastado con una segunda cepa de prueba.

#### 8.4.2 Método de Kneteman.-

Kneteman colocó películas de plástico como barreras de oxígeno sobre las placas, para mantener la anaerobiosis. La penetración del oxígeno a través de las membranas de plástico puede evitarse poniendo encima capas de agar inoculadas con un microorganismo aerobio o bien, incorporando al medio que se puso encima, un compuesto químico que se combine con el oxígeno.



## 9. MÉTODOS DE CAJAS PETRI.-

El desarrollo de las cajas petri de plástico, con paredes delgadas, planas y translúcidas, ha facilitado la observación microscópica del crecimiento del microorganismo sobre medios sólidos sin tener que preparar cámaras en portaobjetos. Básicamente, el cultivo de la caja petri es simplemente un tipo de cultivo más grande que el de bloque de agar, lo cual permite una preparación rápida y un área mayor en donde pueden crecer diferentes especímenes.

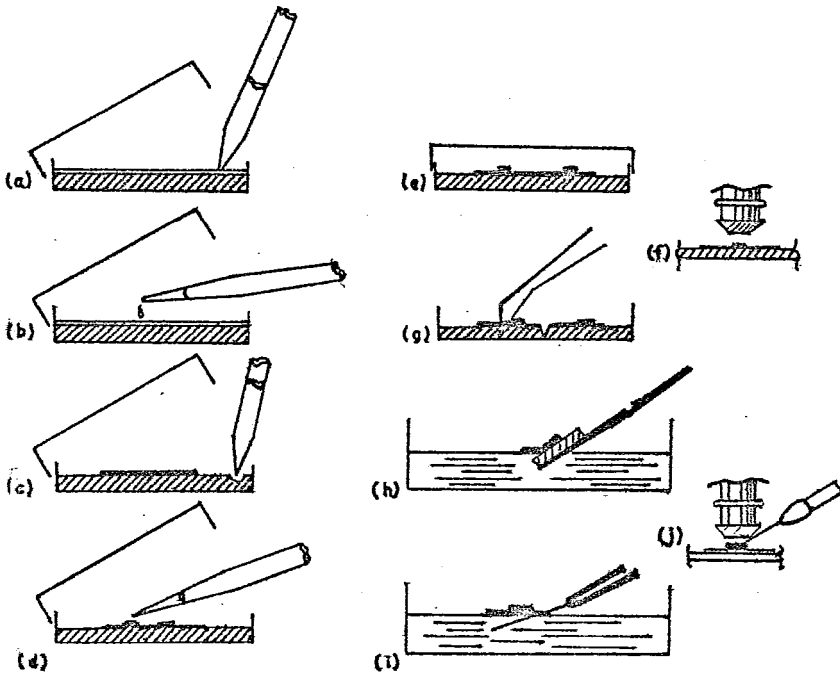
Las microcolonias que se están desarrollando sobre la superficie de agar de una caja petri, pueden observarse directamente con microscopio de contraste de fases con lentes de alto poder, o bien, bajo el objetivo de inmersión cubriendo primero el desarrollo con un cubreobjetos. Si se requiere, -- pueden cortarse pequeños bloques del agar y se pueden hacer preparaciones improntas sobre los cubreobjetos las cuales después, se fijan y se tiñen.

Mahoney y Chadwick describieron un método rápido para medir la sensibilidad a antibióticos, basado en la inhibición de la formación de microcolonias sobre la superficie de placas de agar que contienen antibiótico, encontrando que se obtenían buenos resultados en comparación con las pruebas en --

las que se usaban discos.

### 9.1. Método de Hiller.-

Hiller describió un método que permite el estudio del desarrollo de microcolonias en microscopía electrónica después de un período de observación en microscopía de luz.



Como se muestra en este esquema, la superficie de una placa de agar, muy delgada se inun-

da (a) con agua destilada estéril con ayuda de una pipeta; después se aplica una gota (b) de colodión (0.5-1% en acetato de amilo) y se esparce rápidamente. Se evapora completamente el solvente ya que es un inhibidor del crecimiento; se inclina la placa para quitar completamente la capa de agua, quedando (c) la película de colodión tendida sobre la superficie del agar. (d) se aplica una pequeña gotita de suspensión en agua o salina del microorganismo de prueba, y se incuba (e) la preparación como es requerido. (f) Cuando el crecimiento ha llegado a la etapa deseada determinándolo con microscopía de luz, (g) se separa un área escogida del agar y la membrana y (h) se hace resbalar la tajada del agar bajo una superficie de agua destilada, de tal manera que la membrana flota sobre la superficie, llevando a los microorganismos sobre su lado superior. La membrana flotante se recubre después con una malla enrejada apropiada para la microscopía electrónica. (i) Se quita cualquier exceso de agua de abajo con un papel filtro y se vuelve a examinar bajo el microscopio de luz (j) antes del tratamiento para la observación en el microscopio electrónico.

También es posible hacer crecer las bacterias sobre películas de celofán extendidas sobre la superficie

de una caja de agar. En todos estos casos es necesario conservar la humedad del medio ambiente porque de lo contrario muchas especies tienden a formar una colonia rugosa y dura. La técnica de discos de celofán permite transferir los organismos de un tipo de medio a otro, - con un mínimo rompimiento de las células. Para facilitar las observaciones, las rejillas se marcan sobre el celofán con una navaja.

## 10. MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN AGAR. -

Beijerinck se dió cuenta de que al poner gotas de soluciones nutritivas o nutrientes sólidos sobre la superficie de placas sembradas con bacterias, levaduras y mohos, se difundían en el medio permitiendo zonas de -- crecimiento del organismo; incluso observó que las sus tancias tóxicas para el microorganismo, producen áreas claras alrededor del sitio de establecimiento. Esta -- propiedad de las sustancias, de difundirse en una zona limitada del medio agarificado, permite la utilización de varias de esas sustancias en una placa de tamaño nor mal lo cual constituye una miniaturización especialmente útil ya que además de que la cantidad de medio utili zado por prueba es muy pequeña, la manipulación es muy sencilla y el material usado, muy poco.

Beijerinck fué el precursor de un gran número de métodos de difusión en agar, para determinar los requerimientos nutricionales de microorganismos, para pruebas de inhibición del crecimiento, pruebas de enzimas, etc.

Existen varias formas de poner las sustancias que van a servir para el experimento, por ejemplo: se pueden poner pequeños cilindros llenos de antibiótico sobre placas de agar sembradas, éstas se incuban y se observan zonas de inhibición, siendo su diámetro propor-- cional a la concentración del antibiótico. Otros auto

res han usado discos de papel saturados con antibiótico y a partir de esta técnica surgieron los multidiscos -- que se utilizan actualmente para pruebas de rutina. Para estudios de microdifusión en gel, Feinberg utilizó - una máscara de plástico con perforaciones pequeñas para la aplicación de la muestra; la máscara de plástico limita el contacto entre el agar y la muestra.

Las pruebas de difusión en agar no están limita-- das al uso de cajas petri, ya que por ejemplo, Epstein ha usado recipientes de uso doméstico, cubiertos con tapas de vidrio, en donde caben aproximadamente 150 zonas de crecimiento.

A continuación se presenta una lista parcial de - pruebas de difusión en agar:

-Enzimas:

- amilasas
- arabinasa
- celulasa
- colinesterasa
- fosfatasas
- lecitinasa
- hialuronidasa
- penicilinasas
- ureasa

-Otras propiedades fisiológicas:

- producción de acetoina
- producción de ácido
- ácido glutámico
- cistina
- histidina

- isoleucina
- leucina
- metionina
- fenilalanina
- serina
- triptofano
- fermentación de carbohidratos
- producción de indol
- rojo de metilo
- hidrólisis de la urea
- vitaminas: biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, riboflavina, tiamina, B<sub>12</sub>.
- Voges Proskauer
- antibióticos
- toxinas microbianas

## 10.1 PRUEBAS CON ANTIBIOTICOS Y OTROS COMPUESTOS INHIBIDORES.-

El método del disco de papel impregnado con antibiótico, para pruebas de sensibilidad, ha sido adoptado por muchos investigadores y por lo tanto ha tenido múltiples modificaciones.

### 10.1.1 Método de McDaniels.-

McDaniels solucionó el problema de hacer una prueba de sensibilidad sobre muchos cultivos. Para ello, se coloca una tira grande de papel filtro impregnada con antibiótico, sobre una placa con medio de cultivo en la cual se habían --

inoculado los microorganismos de prueba - en estrías perpendiculares a la tira de - papel.

#### 10.1.2 Método de Scherr.-

Scherr y sus colaboradores efectuaron muchas pruebas sobre cultivos simples utilizando discos con muchos extremos salientes conteniendo un antibiótico diferente en cada extremo; esta técnica se emplea ahora rutinariamente, simplificada - por la fabricación comercial de tales discos con múltiples antibióticos, perfectamente estandarizados.

Pruebas similares a las de la inhibición se han desarrollado para detectar y probar una variedad amplia de materiales biológicos. Teóricamente, una difusión en agar para una prueba de -- inhibición o de crecimiento es posible para cualquier compuesto.

#### 10.2 PRUEBAS PARA TOXINAS MICROBIANAS.-

Petri, en 1932, observó que se formaba un halo alrededor de las colonias de meningococo que crecían sobre una placa de agar a la cual se le -



había añadido suero antimeningococo. El halo re-  
presenta una precipitación específica formada por  
la interacción del anticuerpo en el suero con el  
antígeno específico del microorganismo. A partir  
de esta observación, se han ideado numerosas prue-  
bas, especialmente para toxinas microbianas.

#### 10.2.1 Método de Petri y Steabben.-

Ellos introdujeron un método de di-  
fusión en agar para detectar la toxina --  
producida por *Cl. sporogenes*. La antito-  
xina se incorpora al medio de cultivo. --  
Después de una incubación apropiada se ob-  
serva un anillo opaco alrededor de las co-  
lonias toxigénicas, tal como se forma en  
el proceso de Ouchterlony. *Cl. tetani* y  
*Cl. botulinum* incluso han sido identifi-  
cados sobre este tipo de placas gracias a  
la especificidad de las antitoxinas.

#### 10.2.2 Método de Elek.-

Se colocan varios organismos de -  
prueba en estrías paralelas a una placa -  
de medio; se sumerge una tira de papel --  
filtro en antitoxina y se coloca perpendi-  
cular con respecto a los inóculos. Des-  
pués de la incubación, las cepas toxigéni-  
cas se marcan visiblemente por el precipi-

tado formado de toxina-antitoxina.

### 10.3 PRUEBAS PARA ENZIMAS.-

Las pruebas de difusión en agar son muy convenientes para las pruebas de enzimas por el gran número de muestras que se pueden procesar en un sólo paso. Las pruebas clásicas para enzimas, aunque resultan más precisas, son mucho más laboriosas.

#### 10.3.1 Métodos para amilasas.-

##### 10.3.1.1 Método de Wijsman.-

Wijsman usó métodos de difusión en gel para estudiar enzimas de la cebada, y utilizó un método similar para estudiar amilasas fúngicas. Se coloca el microorganismo o la preparación de la enzima sobre una placa con -- substrato, se incuba y luego se le hace fluír yodo para observar las zonas de hidrólisis del almidón. Las muestras se pueden poner en microgotitas con una pipeta sobre una placa. Para que no interfieran entre sí los halos -

de los diferentes microorganismos, se hacen primero pruebas para ver cuántos caben en cada placa y además se puede poner una mayor cantidad de substrato o una menor cantidad de la suspensión de microorganismos.

#### 10.3.1.2 Método de Cook.-

El usó placas de diferentes almidones para identificar diferentes tipos de amilasas en alimentos. Se inoculan y revelan como en el caso anterior.

#### 10.3.1.3 Método de Iyer y Karthiayani.-

En lugar de inundar las placas de almidón con soluciones de yodo para revelar las zonas de actividad de la amilasa, ellos colocan un pequeño cristal de yodo en la tapa de la caja, se vuelve a colocar el fondo de la caja y se entibia pasándola sobre una flama. Entonces el yodo se volatiliza hacia el medio.

### 10.3.2 Métodos para proteasas.-

#### 10.3.2.1 Método de Frazier.-

Desarrolló una placa de agar-gelatina a la cual se le pone una solución de ácido tánico al 1% o una solución de cloruro mercúrico para desarrollar zonas de hidrólisis después de que han crecido los microorganismos sobre la placa.

#### 10.3.2.2 Método de Lewis.-

Estudió la acción de diferentes proteasas sobre placas de agar con leche, y se observaba un aclaramiento alrededor de las colonias.

### 10.3.3 Métodos para esterases.-

#### 10.3.3.1 Método de Rath.-

Utiliza una placa con tres capas: una capa base de agar con agua, después una capa de agar nutritivo inoculado, y después de que se han formado las colonias, se pone encima una capa de agar que contiene el substrato.-

Los substratos para la detección de lipasas pueden ser: etilbutirato, tripalmitato, trioleato, - triacetina, etc.

#### 10.3.4 Métodos para penicilinasas.-

Una prueba para la detección y evaluación de bacterias productoras de penicilinas se efectúa poniendo las cepas a probar sobre un medio de cultivo que contiene penicilina y que ya está inoculado con un cultivo susceptible a la penicilina. El cultivo sensible, crece formando colonias satélites alrededor de las cepas productoras de penicilinasas.

##### 10.3.4.1 Método de Manson.-

El efectuó otra prueba para la detección de penicilinasas, utilizando una placa de triple - capa de medios; todas las capas contienen fuchsina ácida decolorada 1:25. La capa base consta de 15 ml. de agar al 1.5%. La segunda es una capa sembrada con *Bacillus cereus* ó *Bacillus subtilis* en 7 ml de agar al 3%; y la

última capa son 7 ml de agar al 3%. Después de incubar toda la noche a 30°C se colocan sobre cada placa, 300,000 unidades de penicilina en 2 ml. Las colonias positivas se vuelven rojas en el lapso de 15 minutos debido a la formación de ácido peniciloico, mientras que las colonias negativas permanecen incoloras por varias horas.

#### 10.4 PRUEBAS DE FERMENTACIONES DE CARBOHIDRATOS.-

##### 10.4.1 Método de Clarke y Steel.-

Ellos colocan discos de papel que contienen los carbohidratos, directamente sobre medio sembrado para el estudio de reacciones de fermentación. Todos los ingredientes se difunden de los discos, pudiendo dar las reacciones siguientes: color rojo por la formación de acidez, ya que el medio contiene rojo neutro; burbujas en el agar alrededor de los discos si el cultivo produce grandes cantidades de gas y ennegrecimiento del medio alrededor y abajo del disco por la formación de  $H_2S$ , ya que el medio contiene citrato férrico.

#### 10.4.2 Método de Spaur y Wynne.-

Ellos pusieron tres tiras de papel impregnado con carbohidrato dentro de cada una de dos placas de agar-desoxicolato para la detección de bacterias entéricas. Las tiras contienen glucosa, sacarosa y lactosa en una placa, y en la otra manitol, xilosa y arabinosa. Las estrías se siembran en forma perpendicular a las tiras, poniendo cuando mucho cuatro cultivos diferentes por placa; para detectar la formación de gas puede cubrirse la tira con un pedazo de vidrio de 11 x 15 mm.

#### 10.5 MÉTODOS PARA VITAMINAS, AMINOACIDOS Y FACTORES DE CRECIMIENTO.-

##### 10.5.1 Método de Taubeneck.-

El hizo un método de siembra de productores de aminoácidos usando réplicas de placas. Primero se pone material para producir cerca de 30 colonias por placa; después se hacen réplicas de la placa inicial en placas adicionales conteniendo precursores de diversos aminoácidos. Estas placas se incuban hasta que haya crecimiento y después se esterifi

lizan bajo luz ultravioleta y se cubren con agar mínimo sembrado con diferentes auxótrofos (microorganismos que requieren aminoácidos). Los auxótrofos crecen sólo en áreas sobre las colonias productoras del aminoácido requerido; estas áreas pueden ser localizadas sobre una placa de medio completo.



## 11. MÉTODOS DE TIRAS DE PAPEL Y DISCOS.-

La detección y caracterización de compuestos sobre papel, ha sido conocida desde hace algún tiempo. - Con el advenimiento de la cromatografía en papel se desarrollaron un gran número de métodos para identificar compuestos sobre papel para fines biológicos y químicos. En esta sección se verán varios métodos para la localización de enzimas específicas sobre papel, para ayudar al recuento de microorganismos de la orina y de otros fluidos, así como medio de transporte para pruebas de diagnóstico en sistemas microbianos.

En los ejemplos citados aquí no se menciona a todos los microorganismos y sus productos, pero todos son aplicables a sistemas microbianos.

A continuación se muestra una lista parcial de algunas pruebas en tiras de papel para pruebas de identificación de cultivos:

- fosfatasa alcalina
- amilasa
- arginasa
- catalasa
- oxidasa
- peroxidasa
- proteínasa
- ureasa
- utilización de citrato
- fermentaciones: glucosa, inositol, lactosa, mal  
tosa, manitol, sacarosa, xilosa,

formación de gas.

- producción de  $H_2S$
- índol
- prueba de rojo de metilo
- reducción de nitratos
- Voges Proskauer

## 11.1 DETECCION DE ENZIMAS.-

### 11.1.1 Método de Sastri y Sreenivasaya.-

Ellos colocaron una gota de solución de substrato y una gota de muestra sobre una tira de papel filtro de 3 x 1/2 pulgadas; el papel se incubaba en una jarra húmeda, durante 30 a 60 minutos; después se examina para ver los productos de reacción esperados. De esta manera, se detectan varias hidrolasas usando el substrato adecuado con solución de Fehling y un calentamiento.

### 11.1.2 Método de Lissitzky.-

Lissitzky determinó rápidamente las actividades de preparaciones enzimáticas, sumergiendo una tira de papel filtro en esa preparación y después en un substrato amortiguado. El substrato asciende en la tira por acción capilar y los productos -

de reacción solubles emigran en el frente; después de un tiempo deseado se revela la tira de papel.

Las determinaciones de ureasa y urea han recibido la mayor atención; una tira de papel filtro impregnada con urea-fenolftaleína se sumerge en una suspensión bacteriana espesa; la coloración roja de la tira indica la producción de ureasa. Esta prueba de ureasa se lleva a cabo en un máximo de 2 horas.

## 11.2 DETERMINACIONES PARA SENSIBILIDAD AL ANTIBIOTICO.-

Además de los métodos ya descritos de difusión en agar, son útiles los siguientes métodos en papel, para determinaciones de sensibilidad a antibióticos.

### 11.2.1 Método de Ryan.-

Un papel con ocho salientes, cada una impregnada con un antibiótico diferente, medio de cultivo y trifeníl-tetrazolio, se coloca en una bolsita de plástico y se sella; para hacer la prueba, se saca el papel con forceps estériles y se moja

poniéndolo sobre agua estéril por la cara inferior durante pocos segundos; después se regresa a su empaque de plástico; la superficie superior se impregna con el material infeccioso, se cierra el empaque de plástico con cinta adhesiva y se incuba la preparación a 37°C durante 3 a 12 horas. El inóculo no crece ni reduce el trifeniltetrazolio en los extremos que contienen antibióticos inhibidores.

#### 11.2.2 Método de Bieringer.-

Bieringer usó equipos de plástico para la determinación de antibióticos; se usa una caja de plástico que tiene 28 depresiones y en cada una de éstas, se pone un disco de papel impregnado con medio de cultivo, cloruro de trifenil-tetrazolio (TTC) al 0.0375% y un nivel alto o bajo de antibiótico. Después se inoculan los discos directamente con 0.15 ml (3-4 gotas) de muestra, tal como orina, o de una suspensión ligeramente turbia del microorganismo de prueba; se pone la tapa a la caja y se incuba a 37°C durante 3 horas o un poco más. El cambio de color de los discos tratados respecto a los discos control, resulta de la reducción del colorante, a rojo formazán, por el metabolismo -

bacteriano y es inversamente proporcional a la eficacia del antibiótico contra el organismo de prueba.

La resazurina puede usarse en circunstancias similares; de hecho, Kanazawa encontró que es más sensible que el TTC, y resultó ser menos inhibidora que los compuestos de tetrazolio para las bacterias.

### 11.3 TIRAS DE PAPEL COMO TRANSPORTE.-

También se han usado tiras de papel filtro secadas, como medio de transporte para mandar especímenes a laboratorios bacteriológicos.

#### 11.3.1 Método de Hollinger.-

Los patógenos entéricos y algunas bacterias de la cavidad oral sobreviven mejor al secado y al transporte por este método, que la mayoría de los no patógenos, de modo que se da un relativo enriquecimiento en el porcentaje de patógenos. Hollinger, aprovechó esto para el desarrollo de un procedimiento para recuperar estreptococos de la garganta. Usó una compresa de dacrón para el enjugado inicial,

la cual se seca y se envía al laboratorio en un tubo, o bien, se restrega en una tira de papel filtro de 2 x 5 cm, colocada entre dos tiras protectoras de vidrio, -- las cuales están dentro de una doble pared de lámina de aluminio pesado. Cuando se recibe todo el equipo en el laboratorio, se extrae la tira y se coloca boca abajo sobre la superficie de un medio de cultivo con agar; se ponen dos tiras por placa. En el procedimiento original, las tiras se incuban 18 horas adicionales a 37°C. En las placas primarias se observaron colonias de *Streptococcus* beta-hemolíticos y de otras bacterias; en las placas réplicas se vió lisis debida a la presencia de *Streptococcus* beta-hemolíticos, - pero en las placas réplicas nunca se encontró *Staphylococcus*.

#### 11.4 OTROS METODOS.-

##### 11.4.1 Método de Boyer.-

Este investigador utilizó discos de papel filtro para la identificación de microorganismos anaerobios.

En este método, se inocular la superfi

cie de una caja con agar mediante un algo  
don estéril saturado con la suspensión --  
del organismo a probar; se seca la placa  
en una atmósfera de  $N_2$ , y sobre la super-  
ficie seca se ponen 5 discos de 6.5 mm de  
diámetro cada uno con un carbohidrato di-  
ferente, tales como: arabinosa, fructosa,  
glicerol, glucosa, lactosa, maltosa, mani-  
tol, sacarosa y xilosa, adicionado de me-  
dio basal para carbohidratos (Difco); se  
pone también un disco control sin carbohi-  
drato, sólo con medio basal.

Para las pruebas correspondientes -  
se aplica al disco caldo indol nitrato --  
BBL mientras está caliente, y se seca en  
una atmósfera de  $N_2$ ; para la prueba de hi-  
drólisis de la esculina se aplica al dis-  
co caldo peptona extracto de levadura con  
0.5% de esculina. Los discos pueden alma-  
cenarse en atmósfera de  $N_2$  a  $10^\circ C$  durante  
2 meses.

Después, las placas inoculadas y --  
con los discos se incuban a  $35^\circ C$  en una -  
jarra GasPak. Como el substrato se difun-  
de uniformemente del disco hacia el medio  
de cultivo, el crecimiento aparece cir-  
cunscrito a la periferia de cada disco.

Para leer los resultados de fermen-  
tación de carbohidratos, se pone una go-  
ta de azul de bromotimol al 1% sobre ca-  
da disco después de haber obtenido un --  
crecimiento visible, y el cambio de color  
de azul verde a amarillo se interpreta -  
como una reacción positiva.

Cuando el crecimiento es visible -  
cerca del disco con esculina, se le agre-  
ga una gota de citrato de amonio férrico  
al 1%; un precipitado negro se interpre-  
ta como una reacción positiva.

La reducción de nitratos se prueba  
por la adición de una gota de ácido sul-  
fanílico al 0.8% en ácido acético 5N y -  
una gota de alfa-naftil-amina al 0.5% en  
ácido acético 5N; el color rojo indica -  
una reacción positiva; si aparecen resul-  
tados negativos pudiendo ser por la for-  
mación de otros productos reducidos, se  
pone una cantidad pequeña de polvo de ---  
Zinc en el disco y la aparición de un co-  
lor rojo confirma la reacción negativa.

La ventaja de este método es la --  
flexibilidad con que se pueden seleccio-  
nar diferentes substratos para probarse;  
además de que resulta ser un procedimiento



to económico, reproducible y fácil de llevar a cabo.

#### 11.4.2 Método de la Warner-Lambert Company.-

Ellos utilizan placas MICRO-ID que son charolas comercializadas, las cuales llevan incluidos, discos de papel filtro impregnados con diferentes reactivos para efectuar pruebas de identificación de microorganismos.

En 1979 el Dr. Fannin pudo diagnosticar un caso de peste bubónica gracias - al uso de la placa MICRO-ID, debido a que no requiere de crecimiento para proporcionar los resultados y entonces no importa mucho si la temperatura de incubación no es la óptima. Por ejemplo, cuando no se tiene idea de qué microorganismo puede - tratarse, el cultivo se incuba generalmente a 37°C y en este caso resulta difícil obtener un buen crecimiento de *Y. pestis* porque su temperatura óptima de crecimiento es de 25°C, lo cual no afecta los resultados al usar la placa MICRO-ID.

En identificaciones de rutina para la diferenciación entre algunos microorganismos la placa MICRO-ID ha presentado --

los resultados siguientes:

PRUEBA	MICROORGANISMO	REACCION		COLOR FINAL DE LAS REACCIONES POSITIVAS Y NEGATIVAS.
		POSITIVA MINIMA	NEGATIVA	
Voges Proskauer	<i>K. pneumoniae</i>	1:64		Rosa a Rojo
	<i>E. coli</i>		-	Amarillo pálido.
Nitrato	<i>E. coli</i>	1:128		Rojo
	<i>A. faecalis</i>		-	Variable de incoloro a rosa pálido.
Fenilalanina-Desaminasa	<i>Pr. vulgaris</i>	1:16		Verde
	<i>E. coli</i>		-	Amarillo pálido.
Indol	<i>E. coli</i>	1:64		Rosa a Rojo
	<i>K. pneumoniae</i>		-	Variable de amarillo pálido a naranja.

PRUEBA	MICROORGANISMO	REACCION		COLOR FINAL DE LAS REACCIONES POSITIVAS Y NEGATIVAS.
		POSITIVA MINIMA	NEGATIVA	
Ornitino-des-carboxilasa	<i>Pr. mirabilis</i>	1:16		Gris a púrpura
	<i>K. pneumoniae</i>		-	Amarillo
Lisina-des-carboxilasa	<i>E. coli</i>	1:32		Gris a púrpura
	<i>Pr. vulgaris</i>		-	Amarillo
Malonato	<i>K. pneumoniae</i>	1:32		Verde a azulad do
	<i>E. coli</i>		-	Amarillo
Ureasa	<i>Pr. vulgaris</i>	1:128		Naranja a Rojo Púrpura
	<i>E. coli</i>		-	Amarillo
Esculina	<i>K. pneumoniae</i>	1:256		Pardo a negro
	<i>E. coli</i>		-	Sin cambio de color
Arabinosa	<i>K. pneumoniae</i>	1:256		Amarillo a ám bar oscuro
	<i>Pr. vulgaris</i>		-	Púrpura

PRUEBA	MICROORGANISMO	REACCION		COLOR FINAL DE LAS REACCIONES POSITIVAS Y NEGATIVAS.
		POSITIVA MINIMA	NEGATIVA	
Adonitol	<i>K. pneumoniae</i>	1:128		Amarillo a ámbar oscuro.
	<i>Pr. vulgaris</i>		-	Púrpura
Inositol	<i>K. pneumoniae</i>	1:64		Amarillo a ámbar oscuro.
	<i>Pr. vulgaris</i>		-	Púrpura
Sorbitol	<i>K. pneumoniae</i>	1:256		Amarillo a ámbar oscuro.
	<i>Pr. vulgaris</i>		-	Púrpura

#### 11.4.3 Método con Pathotec "Rapid I-D System".-

Este método consiste en la utilización de 10 tiras reactivas independientes, comercializadas por la compañía General Diagnostics, las cuales tienen aplicadas determinadas cantidades de reactivos para la identificación de microorganismos.

La técnica a seguir es la siguiente:

- Efectuar el aislamiento del microorganismo.
- Extender 1-2 colonias en la tira de citocromo oxidasa (CO) y observar la coloración de la misma a los 30 segundos.
- Realizar una suspensión del microorganismo (4-6 colonias) en 3 ml de solución salina y repartir 0.3 ml de dicha solución en 8 tubos diferentes. A cada tubo, colocar una tira de los siguientes tipos de Patho-Tec: N (reducción de nitrato); PD (Fenilalanina desaminasa); U (Ureasa); I (producción de Indol); H<sub>2</sub>S ; LD (Lisina descarboxilasa); VP (Voges-Proskauer) y M (utilización de Malonato).
- En otro tubo seco colocar la tira correspondiente a la hidrólisis de la esculina (E), previa extensión del germen sobre la tira y humidificación de la misma con solución salina.
- Incubar los 9 tubos a 37°C durante 4 horas.
- Observar las coloraciones finales y clasificar al microorganismo según los resultados obtenidos mediante la tabla siguiente:

	CO	N	PD	U	I	H <sub>2</sub> S	LD	VP	M	E	Motilidad 37°C
<i>Escherichia coli</i>	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>Shigella</i> spp.	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i> .	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>Salmonella</i> spp.	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
<i>Arizona hinshawii</i>	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
<i>C. diversus</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>K. rhinoscleromatis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>K. ozaenae</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>E. aerogenes</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>E. liquefaciens</i>	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>E. hafniae</i>	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>E. agglomerans</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
<i>Proteus vulgaris</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>P. mirabilis</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
<i>P. morgani</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>P. rettgeri</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Providencia</i> spp.	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+

+ 90% ó más de los cultivos positivos

- 90% ó más de los cultivos negativos

± la mayoría de los cultivos positivos

± la mayoría de los cultivos negativos.

NOTA: Al hacer la identificación, las reacciones del tipo ± ó ± no deben ser valoradas con la misma evidencia que las pruebas absolutamente + y -.

Con el uso de este sistema se presentan las siguientes ventajas:

- Rapidez: La identificación del 95% de los microorganismos se efectúa a las 4 horas del aislamiento del germen.
- Exactitud: La concordancia en los resultados obtenidos es superior al 97% con los métodos clásicos.
- Flexibilidad: Evita la obligación de utilizar todo el sistema cuando el bacteriólogo, sólo desea determinadas pruebas.
- Estabilidad: Las tiras se someten a desecación para garantizar su exactitud, estabilidad y conservación.

## 12. MÉTODOS DE SUBSTRATO EN PELÍCULA.-

### 12.1 Método de Gates.-

Gates fué probablemente el primero en usar las placas fotográficas para titular enzimas proteolíticas. Usó cámaras pequeñas que se llenan hasta el borde con solución enzimática y se les coloca en la cima una placa fotográfica; las partículas de plata se desprenden de la superficie por la acción de la proteasa.

La actividad de la gelatinasa se estima por la cantidad de plata liberada en la cámara o por la cantidad desgastada de la placa.

### 12.2 Método de Davies.-

Davies hizo una modificación del método anterior colocando la solución enzimática directamente sobre la placa fotográfica del tamaño de un portaobjetos y alumbrándola con una linterna; se incuba en una cámara húmeda, después de lo cual se enjuaga y se tiñe con fuchsina o hematoxilina. Esta técnica puede realizarse debido a que la gelatina es una proteína que presenta fácilmente la transformación de sol a gel, y como existe igual cantidad de agua en el gel como en el sol, pueden difundirse los iones a través del gel, lo cual se demuestra con el hecho de que al poner una gota de colorante en la superficie



del gel, ésta se difunde.

Thirst empleó películas de gelatina sobre portaobjetos, obteniendo iguales resultados que con películas fotográficas.

### 12.3 Método de Bond.-

El hizo películas de almidón (2% de almidón más 4% de agar sobre placas de vidrio) que sirvieron para detectar con gran sensibilidad la actividad de la amilasa. También se han aplicado otros tipos de capas a portaobjetos para estudios del suelo con placas enterradas.

Sin embargo, no se ha desarrollado todo el potencial de las técnicas de substrato en película para la Microbiología; más bien se han desarrollado extensamente los métodos de substrato en película para la localización histoquímica de las actividades de enzimas.

Para el microbiólogo interesado en estas técnicas, sin duda es fácil adaptar los métodos histoquímicos al estudio de microorganismos.

### 12.4 Adaptación del método de Daoust.-

Me permito proponer la siguiente adaptación del método de Daoust.

Se coloca un substrato en película sobre -

un portaobjetos y sobre él se pone una gota del -- cultivo a probar; pueden probarse hasta 5 ó 6 cultivos diferentes en un portaobjetos. Se incuba la preparación en una cámara húmeda, y después si es necesario, se revela la película con el indicador adecuado para el substrato (o productos) de la enzima en estudio.

De esta manera pueden detectarse: amilasa, - proteasa, nucleasa y hialuronidasa, usando películas de gelatina más el substrato indicado.

ENZIMA	SUBSTRATO	REVELADOR
amilasa	almidón	lugol
hialuronidasa	hialuronato de sodio	ácido acético 2N.
proteasas	leche descremada.	no es necesario, se observa -- aclaramiento alrededor de las colonias.
	agar con yema de huevo	no es necesario, se observa un halo claro.
	gelatina	licuefacción de la gelatina
nucleasa	ácido nucléico	HCl 1N.

### 13. METODO DEL ASA CALIENTE. -

Dado que la producción de  $\text{CO}_2$  a partir de glucosa es un dato tan útil en la identificación de bacterias ácido-lácticas, se han desarrollado en los últimos tiempos, varios métodos para detectar la producción de  $\text{CO}_2$ .

Los macrométodos convencionales son:

- precipitación con hidróxido de Bario, de Williams y Campbell.
- desplazamiento del tapón de agar, de Gibson y Abdel-Malek.

Describiremos el método miniaturizado del asa caliente desarrollado por Sperber y Swan en 1976, y hablaremos después de su eficacia frente a estos métodos convencionales.

Ya desde tiempos anteriores, Hammer y Baker habían notado la producción de gas cuando se sumergía una aguja caliente en cultivos de leche tornasolada; - Leichmann observó la producción de gas insertando una aguja inoculante caliente, dentro de los cultivos en suero-gelatina.

El método del asa caliente se lleva a cabo de la siguiente manera: Se crecen los cultivos en el medio ADAC que es medio APT de Difco, adicionado de 1% de --

dextrosa y 0.5% de acetato de sodio. La composición -- del medio APT es:

Extracto de levadura - Bacto .....	7.5 g
Triptona - Bacto .....	12.5 g
Dextrosa - Bacto .....	10.0 g
Citrato de Sodio .....	5,0 g
Clorhidrato de Tiamina .....	0.1 g
Cloruro de Sodio .....	5.0 g
Fosfato dipotásico .....	5.0 g
Cloruro de Manganeso .....	0.14g
Sulfato ferroso .....	0.04g
Sorbitán-Monooleato .....	0.2 g

Después se incuban a 27°C durante 24 horas; luego se sumerge rápidamente en el cultivo un asa calentada - al rojo vivo, y se observa el desarrollo de gas en forma de un flujo de burbujas. Los cultivos negativos se vuelven a probar después de 24 horas adicionales de incubación.

Por este procedimiento se ha detectado producción de  $\text{CO}_2$  en todos los cultivos en los cuales se precipitó con  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ; sin embargo, sólo un 55-66% han resultado positivos por el procedimiento del desplazamiento del tapón de agar. Después de haber probado diferentes tipos de asas, se encontró que el alambre de cromo es el más satisfactorio.

METODO	MEDIO DE CULTIVO	REACCIONES POSITIVAS	
		Número	%
Precipitación con Ba(OH) <sub>2</sub>	Caldo ADAC	141	100
Asa caliente	Caldo ADAC	141	100
Tapón de agar	Agar ADAC y Gelatina V-8	77	55
		93	66

Analizando los resultados de esta tabla, puede decirse que el procedimiento del asa caliente es tan seguro como el método convencional de precipitación con hidróxido de Bario, y que es muy conveniente para la determinación del CO<sub>2</sub> producido por bacterias ácido lácticas en un tiempo de incubación corto; es igualmente - - útil para determinar la producción de CO<sub>2</sub> por otros microorganismos.

#### 14. MÉTODOS DE PLACA DIVIDIDA.-

La caja de Petri, ha venido a ser un recipiente de cultivo de dimensiones y materiales variados. Aunque pueden tener medidas diferentes, se ha pensado en utilizar su espacio interior en forma más económica, - por lo que se ha ideado subdividirla.

##### 14.1 Método de Churchman.-

Churchman insertó tiras de metal en la caja para poder estudiar el crecimiento de una bacteria en dos medios diferentes en una misma placa.

##### 14.2 Método de Anderson.-

El marcó sectores en una placa individual para poder usarla con varias muestras. Este proceso se usa tanto para pruebas rápidas de factores de transferencia de resistencia a las drogas en Enterobacteriaceae, como para la identificación de bacterias.

##### 14.3 Método de van der Heyde.-

Este autor ideó una de las formas más - - prácticas de subdividir la caja petri.

Se colocan 14 anillos de vidrio de 3.2 cm de diámetro y 1 cm de alto en una caja petri; se

esteriliza el sistema y se llenan los anillos al vertir 25 ml del medio con agar en la caja. En cada anillo se colocan 0.05 ml de uno de los cultivos en estudio, dejando que se absorban en el agar. Se incuba la caja aeróbica o anaeróbicamente según se requiera.

#### 14.4 MÉTODOS DE PLACA DE GOTITA.-

##### 14.4.1 Método de Bronfenbrenner y Schlesinger.-

Estos autores describieron un método de gotita para detectar la fermentación de carbohidratos por bacterias.

Se marca el lado externo de la caja con un patrón, o se pone un patrón de cartón para depositar las gotitas de agar-carbohidrato caliente en el fondo de la caja petri. Dos gotitas sirven como controles y el resto se inocula con un hisopo. Después, se pone una gota fresca de agar-carbohidrato sobre las gotitas primarias para obtener una tensión ligeramente baja.

##### 14.4.2 Método de Lindner.-

Lindner usó un método de gotita para el aislamiento de cultivos puros de -

levadura. Para ello, se diluye una suspensión de levadura hasta que cada gotita contiene, aproximadamente, una célula individual. Después se colocan en el fondo de las cajas petri las gotitas de esa suspensión; se incuba y se observa la formación de las colonias sobre cada gota. El proceso se ha modificado para el cultivo en portaobjetos, y entonces las gotitas pueden observarse microscópicamente. Otro ejemplo de método de placa de gotita es la placa réplica.

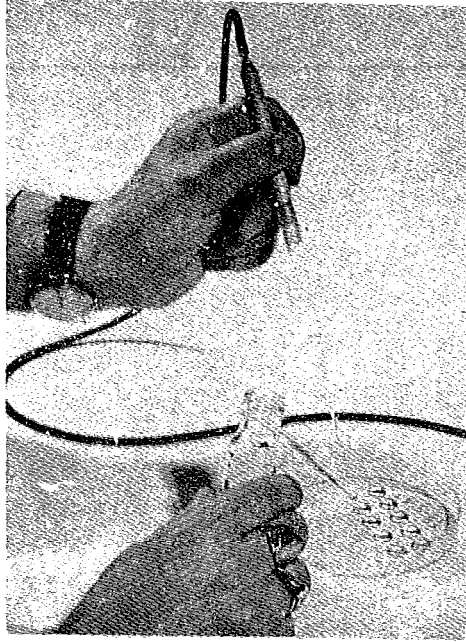
#### 14.4.3 Método de Sharpe, Pettipher y Lloyd.-

Estos investigadores utilizaron una técnica miniaturizada de gotita la cual se describe a continuación:

Se ponen 9 ml de medio de cultivo en cada uno de tres frascos con tapón de rosca, de una onza de capacidad; se esterilizan en autoclave y cuando se van a utilizar se funden y enfrían a 45°C en baño de agua. Con una pipeta insertada en el dilutor/distribuidor, como se observa en la figura siguiente, o con una pipeta, se pone 1.0 ml de la suspensión de la muestra en el primer frasco, se --



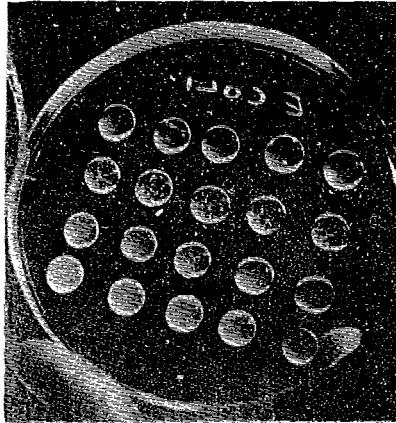
mezcla agitándolo y después se distribu--  
yen 5 gotitas de 0.1 ml en la caja petri  
en línea horizontal.



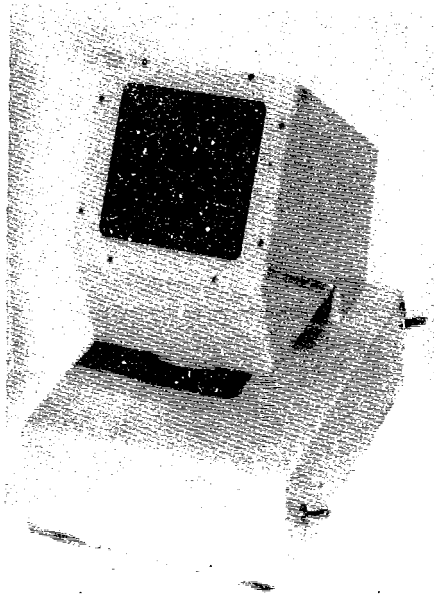
Después se dejan caer 0.1 ml en el  
segundo frasco con medio de cultivo, se -  
mezcla el contenido y con otra pipeta es-  
téril se distribuyen 5 gotitas del segun-  
do frasco en la caja petri, abajo de la -  
primera hilera; y se repite la misma ope-  
ración para el tercer frasco. Con un po-  
co de práctica pueden ponerse las gotitas  
en 40 segundos.

Generalmente si en el método de pla

cas vertidas se necesitan 48 horas de incubación, en el de gotita se requieren de 20 a 24 horas para que todas las colonias tengan una medida contable, como se observa en la siguiente figura:



Las colonias se cuentan en un aumento 10X, ya sea con una lente, el microscopio, o con el telespectador como se observa en la siguiente figura:



Este telespectador es un proyector con pantalla de vidrio. La caja petri se coloca en el espacio para la iluminación; la visibilidad de las colonias en las gotitas es muy buena porque se aumenta su tamaño con el aparato, además de que es fácil diferenciarlas porque adoptan una forma elipsoidal y tienen cierta tendencia a verse de color café oscuro.

Por lo menos se deben contar de 20 a 30 colonias, o sea que si hay 5 colonias en cada gota, se deben contar las 5 gotitas, pero si la cuenta es mayor de 100 colonias por gota entonces sólo deben contarse 1 ó 2 gotas. Se pueden contar fácilmente arriba de 200 colonias.

Para efectuar los cálculos se toma en cuenta un factor por las diluciones efectuadas, además de que cada gotita -- contiene sólo 0.1 ml de la suspensión, -- por lo que la cuenta por ml de esa dilución es la cuenta de la gotita x 10. Por ejemplo, si se contaron 25 colonias por gotita en la segunda hilera entonces se hace lo siguiente:

	Factor
muestra en el líquido (10g a 90 ml)	x 10
suspensión en el frasco # 1 (1 ml a 9 ml)	x 10
de frasco #1 a frasco # 2 (0.1 ml a 9 ml)	x 100
de frasco #2 a gotitas de 0.1 ml	x 10

Por lo tanto la cuenta es la siguiente:

$$25 \times 10 \times 10 \times 100 \times 10 = 2.5 \times 10^6 / \text{ml}$$

en la muestra.

En la descripción de esta técnica, los factores de dilución son factores de 10. De este modo, 1.0 ml transferidos a 9.0 ml da una dilución 1:10 ; 0.1 ml --

transferidos da una dilución 1:91 y no 1:100. El error no es muy notable y si las diluciones se hacen siempre con el mismo factor, ya sea x 10 ó 100, entonces pueden ajustarse los volúmenes de medio en los frascos y se elimina totalmente este error.

Este método presenta las ventajas de que puede llevarse a cabo con equipo de laboratorio estándar, reduce el gasto de material, el tiempo de incubación, el trabajo y el consumo de medio de cultivo. Además de que el stress térmico es menor en la técnica de gotita que en la de placa vertida, debido a que el organismo permanece a 45°C sólo durante 40 segundos porque las gotitas al ser liberadas se enfrían a 30°C en 10 segundos, mientras que una serie de placas vertidas requieren más de 10 minutos para que baje la temperatura a 40°C en la mitad de las cajas.

Esta técnica también puede usarse para la enumeración de *Clostridia* spp. - así como para aislamientos anaeróbicos - del intestino; para ello, se colocan las placas con las gotitas en una jarra anaeróbica en donde se pueden colocar hasta

40 muestras, mientras que sólo pueden colocarse de 3 a 4 muestras de placas vertidas en una jarra anaeróbica. Sin embargo, existe una desventaja del método de gotita para el trabajo anaeróbico y es que al tener las gotitas una superficie relativamente grande, permiten una aireación rápida que puede dar lugar a una oxigenación excesiva de los organismos sensibles.

Para el trabajo anaeróbico se deben tomar las siguientes precauciones para evitar cuentas disminuídas:

- Añadir agentes reductores en el medio de agar, por ejemplo ácido ascórbico.
- Poner las placas en una caja con hielo seco ( $\text{CO}_2$ ), mientras se van acumulando las placas suficientes para llenar una jarra anaeróbica.
- Renovar el catalizador en perlititas (Paladio) de las jarras antes de cada incubación.

Esta técnica de gotita ha sido muy útil por ser simple, rápida, eficaz y de bajo costo, además de que da tan buenos resultados como las técnicas de placas -

vertidas y la de número más probable.

#### 14.5 MÉTODOS DE GOTTA EN PLACA.-

##### 14.5.1 Método de Miles.-

Miles utilizó un método de gota en placa para llevar a cabo cuentas de colonias; para ello, se deja caer una gota - del cultivo desde una altura de 2.5 cm - sobre una placa de agar presecada; de este modo la gota se esparce en un área de 1.5 a 2.0 cm<sup>2</sup>.

El cultivo se pone en varias diluciones y las cuentas se hacen en el área de las gotas que contienen el número más grande de colonias sin que se vean amontonadas.

##### 14.5.2 Método de Hedberg.-

Hedberg utilizó placas de gota que tenían agar con agentes antimicrobianos para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los fármacos. Por ejemplo se usan 10 diluciones seriadas en caldo de un especimen clínico, tal como el esputo y varias placas con antibio

ticos diferentes; se coloca una gota de 0.1 ml de cada dilución sobre cada placa; se incuba de 24 a 48 horas a 37°C y se hacen las cuentas relativas para ver la susceptibilidad a los antibióticos. De esta manera se evitan la pérdida de tiempo para hacer el aislamiento de un cultivo puro ó la posibilidad de probar un aislamiento no representativo.

En general, las cuentas de gota en placa fueron un poco más altas y el error estándar fué ligeramente menor que en las de cuenta en placa normales. El método de gota en placa ha sido de uso substancial para una variedad de aplicaciones, pero no ha sido muy aceptado.



## 15. MÉTODOS DE LÍNEA DE BURRI Y TUBOS OVALES.

Estos dos tipos de métodos, al igual que los de placa dividida, buscan economizar medio de cultivo para los casos en que se tienen muestras individuales. - Ambos son cultivos en tubos de agar inclinado, lo cual permite el uso de mayores superficies de agar y su uso resulta más conveniente que el de cajas petri dividi-- das en sectores.

### 15.1 Método de línea de Burri.-

Burri utilizó un asa con capacidad de -- 0.001 ml para sembrar una muestra de leche, en - estrías sobre una superficie de agar inclinado - parcialmente seca en un tubo de ensayo. Después de incubar 3 días a 30°C efectuó la cuenta de -- bacterias.

Más tarde Cunningham y Andrews, observaron que algunas bacterias que crecen utilizando el - método de Burri, no desarrollan con el método de las placas de agar, incubadas a la misma tempera- tura de 37°C.

Sin embargo, debido a las inexactitudes en- contradas por el método de Burri, éste no ha si- do estimado como un método apropiado para la enu- meración de bacterias y resulta adecuado sólo -- cuando no se requiere un alto grado de precisión;

algunos investigadores sugieren utilizarlo en las determinaciones del número de bacterias "relativo" en la leche.

Johns y Desmarais, en 1951 lo usaron para observar el nivel de contaminación bacteriana de la leche y del huevo líquido; y Ross para determinar el contenido microbiano de vegetales antes de ser procesados.

## 15.2 MÉTODOS DE TUBOS OVALES.-

### 15.2.1 Método de Myers y Pence.-

Estos autores, modificaron el procedimiento de Burri, ya que mezclaron -- una asada de muestra (con asa de 0.001 ó 0.01 ml de capacidad) con el agar fundido y enfriado contenido en un tubo de ensayo; después inclinaron el tubo durante la solidificación del agar, e incubaron. Este método produce un área mayor y facilita el recuento de las colonias.

Se obtienen resultados similares en las cuentas de colonias con los métodos de tubos ovales y los de placa estándar a la que se le vierte agar; en algunas pruebas han resultado ser más bajas las cuentas de tubos ovales pero la dife

rencia es muy pequeña por lo que quizá - pueda atribuirse a errores manuales.

Un análisis estadístico de diferencias entre los métodos de tubos ovales y los de cuenta en placa estándar mostró - una mayor concordancia en el de tubos ovales.

El método de tubos ovales es muy recomendado para efectuar cuentas de termodúricos.

#### 15.2.2 Método de Moldavan.-

Moldavan automatizó el proceso de - los tubos ovales y describió un aparato - que toma arriba de 400 muestras, funde y enfría el medio de cultivo en los tubos - simultáneamente.

La cuenta de las colonias en los tubos -- ovales se facilita con un adaptador simple en las máquinas contadoras de colonias que existen en -- los laboratorios.

## 16. MÉTODOS DE PLACA DE CONTACTO. -

La mayoría de los métodos descritos para determinar la contaminación microbiana de diferentes superficies caen dentro de tres categorías:

- métodos de placa de agar
- métodos de placa de agar
- métodos de filtro - de membrana
- compresa de superficie
- enjuague de superficie
- enjuague de superficie

La literatura referente a esos métodos ha sido revisada por Walter y por Angelotti; pero en este trabajo sólo se describirán ciertas "miniaturizaciones".

### 16.1 Método de Angelotti y Foter. -

Describieron un método de placa de agar de contacto directo con la superficie, en el cual se esparce agar estéril sobre un área medida pequeña de la superficie de prueba; después se cubre el agar con la tapa de una caja petri que tiene dentro un papel filtro húmedo; luego se pone esta muestra en una cámara húmeda y se incuba de 16 a 18 horas a 35°C. Después de la incubación se inunda el agar con 2,3,5-trifenil-2-H-cloruro de tetrazolio, para teñir las colonias; se seca la preparación y encima se le pone una rejilla de vidrio, y se cuentan las colonias con ayuda del mi-

croscopio. Se ha visto que este método rinde -- cuentas mayores que otros de los examinados por Angelotti.

#### 16.2 Método de Angelotti.-

Este método consiste en llenar hasta el - borde con agar, una pequeña copa o una tapa con asa para sujetarla, o una caja petri. La superficie de agar se presiona contra una superficie no porosa la cual se desea examinar; se retira - el agar, se incuba y se cuentan las colonias.

#### 16.3 Método de Litsky.-

Litsky sugirió un procedimiento ligera-- mente diferente al anterior, en el cual se corta el extremo en donde va la aguja de una jeringa - hipodérmica de 100 ml, la jeringa estéril se lle na con medio de agar, el cual se deja solidifi-- car; con el émbolo se empuja un poco el agar, ha ciendo presión sobre la superficie a examinar. - Se corta la capa de medio inoculada con un cuchi llo o una espátula estéril y se coloca en una ca ja petri que se incuba.

Cate, para este procedimiento usó las cu-- biertas artificiales de embutidos, como recipien tes para los cilindros de agar.

Otra variante de este método consiste en -

colocar el agar en jeringas o tubos de embutidos y cortar fragmentos cuya altura sea igual o mayor a su diámetro, de modo que se formen pequeños cilindros; éstos se atraviesan por el centro de la cara circular y se ruedan con leve presión sobre la superficie a muestrear. Se incuban en una cámara húmeda haciendo una marca en el punto inicial del muestreo. Para conocer la superficie muestreada se calcula el área lateral del cilindro.

#### 16.4 Método de Förg.

Förg describió un método de tira de papel-agar para contacto directo; se usa una tira de papel impregnada con medio de agar húmedo, la cual se guarda en un sobre estéril; la tira se presiona sobre una superficie como si se estuviera aplicando una venda pequeña y después se levanta hacia arriba. Se le quita el plástico de donde se toma para apoyarla en la superficie, y se vuelve a colocar en su sobre original para la incubación. El tetrazolio se incluye en el medio de cultivo, y entonces las colonias aparecen como puntos rojos sobre el papel.

#### 16.5 Método de Seidel y Plaschke.

Seidel y Plaschke, usaron soportes flexibles e impregnados con agar para el cultivo, de modo que las superficies a estudiar no tuvieran

que ser necesariamente planas. Ellos usaron incluso una película de rayos-X como soporte flexible para ciertos estudios.

La cinta de celofán se ha usado más bien - para coleccionar especímenes de hongos, para estudios de células y morfología de esporas y se recomendaría usarla como soporte flexible para el estudio de la contaminación microbiana de superficies. Se puede pensar que algunos adhesivos - apropiados facilitarían la recolección de microorganismos de superficies no porosas, así como - de superficies húmedas.

## 17. MÉTODOS DE TUBO Y FRASCOS GIRATORIOS.-

### 17.1 Método de Esmarch.-

Un año antes de que Petri anunciara su invento, Esmarch describió el método de tubo giratorio que presenta varias ventajas sobre la caja petri.

En este método, se mezcla el inóculo con agar fundido y enfriado, y se rueda el tubo mientras solidifica el medio para formar una capa -- delgada sobre la pared interna del tubo.

El tubo giratorio da economía de espacio, material y tiempo en comparación con el método de la placa a la que se le vierte agar. Además, existe menos riesgo de contaminación y menor -- problema de que se reseque durante una incubación prolongada; algunos autores, entre ellos -- Wilson, han encontrado más fácil el recuento de colonias en tubos que en cajas.

### 17.2 Método de Gee y Thompson.-

Debido a que algunos investigadores habían tenido dificultad para obtener una distribución satisfactoria del agar sobre las paredes interiores del tubo, Gee y Thompson hicieron unas máquinas que basadas en la fuerza centrífuga, resuelven este problema. Constan de un tubo que



gira rápidamente para distribuir el medio sobre las paredes externas, mientras se le enfría para apresurar la solidificación del medio.

#### 17.3 Método de Mundinger y WoECKEL.-

Estos autores hicieron un aparato con 12 - tubos giratorios para formar capas de agar niveladas sobre las superficies internas de los tubos, colocados horizontalmente.

#### 17.4 Método de Tai.-

Describió una máquina que hace girar 7 viales pequeños, mientras que los enfría con agua. Estos frascos, aún siendo más pequeños, proporcionan un área superficial 0.5 veces mayor que la placa petri estándar de 9 cm de diámetro.

Michaels, Hylkema y Barclay, describieron aparatos para sujetar los tubos giratorios a lo largo del campo microscópico, pudiéndose observar de esta manera, todas las colonias más cercanamente. Tai y Heyningen, proyectaron una imagen sobre la pantalla para hacer cuentas de colonias de frascos giratorios, y pudieron contar -- arriba de 2000 colonias de *Escherichia coli* por frasco.

Los métodos de tubos giratorios han servido para

el aislamiento de bacterias anaeróbicas, principalmente de las de la panza de rumiantes, sembrando en medios de agar pre-reducido. También han servido en la investigación de las bacterias de lácteos, así como en la estimación del número de bacterias viables que permanecen después del tratamiento con bactericidas.

Wilson sometió el método de tubo giratorio a un examen riguroso, obteniendo cuentas más altas, aproximadamente en un 5%, en comparación con las placas vertidas; ésto se debió probablemente a que en los tubos giratorios se mezcla mejor el inóculo con el medio -- porque se disuelven los grupos de bacterias.

Wood encontró que el método de tubos giratorios en determinaciones de *E. coli* en el agua, rinde cuentas iguales o mayores que las obtenidas por el procedimiento del número más probable.

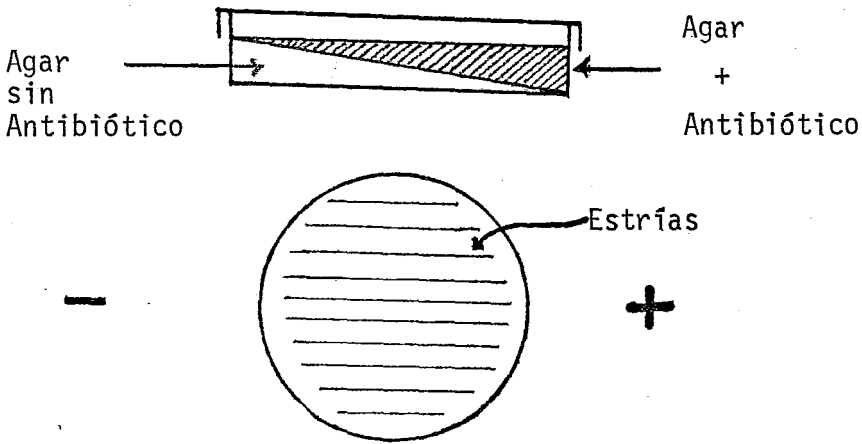
La aplicación más grande y la más investigada, de los tubos giratorios han sido en bacteriología de lácteos, incluso Mulquiny los utilizó para efectuar pruebas de la pasteurización de la leche en un laboratorio con buenos resultados.

## 18. MÉTODOS DE GRADIENTE.-

### 18.1 Método de Szybalski.-

Szybalski preparó placas de agar con un incremento proporcional gradual de concentración - de antibiótico a lo largo de un eje horizontal.

Las placas se preparan vertiendo dos capas de 20 ml de agar. La primera capa de agar simple se deja solidificar con la caja inclinada, - permitiendo que se cubra todo el fondo pero quedando en un extremo una porción muy gruesa del agar. La segunda capa, con el antibiótico se - vierte después de haber colocado la caja en una posición horizontal. El antibiótico difunde hacia abajo, de modo que se diluye en proporción - al grueso de las capas de agar, y se establece - una concentración uniforme del gradiente durante la posterior incubación. Por medio de capilares, se ponen hasta 10 estrías de las suspensiones celulares, paralelas al gradiente de concentración sobre cada placa; ésto hace que el método sea miniaturizado.



Las células resistentes al antibiótico crecen en forma confluyente en la zona de bajo contenido de antibiótico pero también forman colonias en el otro lado. Las colonias resistentes pueden volverse a estriar en la zona de mayor contenido de antibiótico para obtener cultivos incrementados en resistencia..

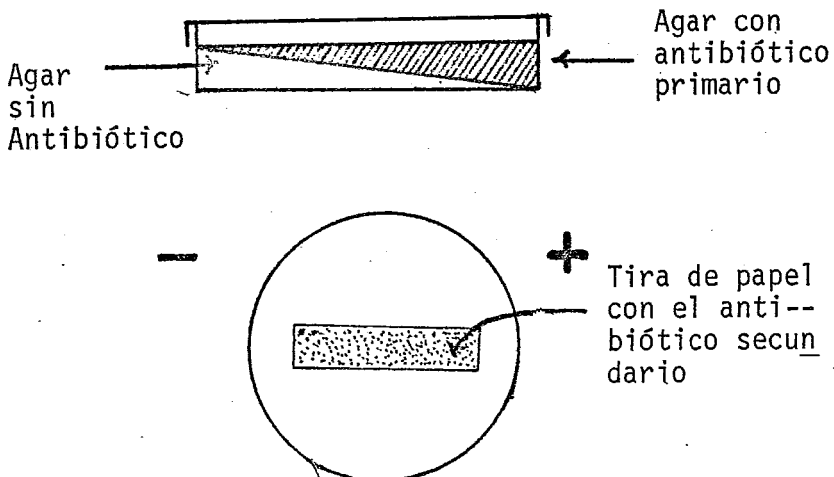
Este método se usa para comparar la resistencia de algunos cultivos a los antibióticos; - Szybalski le dió este uso con óptimos resultados y se ha encontrado que ello se debe a que en esta técnica no influyen los coeficientes de difusión de los antibióticos que en cambio, en pruebas de difusión en agar, hacen necesaria la utilización de curvas de calibración para cada anti

biótico. Se usa también para hacer pruebas semicuantitativas de inhibidores microbianos y para el estudio de factores de crecimiento.

## 18.2 Método de Link.-

Para observar la interacción de dos antibióticos, Link incorpora un antibiótico primario dentro de la placa gradiente, y un antibiótico secundario impregnado en una tira de papel filtro de 0.4 x 8.5 mm; se coloca la tira a lo largo del gradiente del antibiótico primario. Con ello, el antibiótico secundario difunde de la tira en el gradiente de concentración.

De esta manera pueden determinarse las acciones antagonista, indiferente, aditiva o sinérgica de los pares de antibióticos. En la siguiente página se muestra un esquema que ejemplifica este método.



### 18.3 Método de Sacks.-

Sacks preparó una placa de gradiente de pH, para lo cual incluyó  $K_2HPO_4$  en la capa más baja de agar, y  $KH_2PO_4$  en la capa de arriba.

El pH en un rango de 5.6 a 7.8 puede determinarse en cualquier posición de la placa, colocando tiras de papel indicador de pH sobre la superficie de agar. Otras combinaciones buffer -- pueden usarse para diferentes rangos de pH. Para examinar el efecto de pH sobre la acción antibiótica se vierte una capa gruesa de agar, conteniendo antibiótico. También se puede colocar un papel filtro impregnado con antibiótico sobre la placa de gradiente de pH, y se cubre con agar -- inoculado.

Existen otras aplicaciones de este método, por ejemplo si la cama de la superficie contiene 0.2% de almidón soluble y se pone un organismo de prueba en estrías, paralelamente al gradiente de pH, puede determinarse el pH óptimo para la producción de amilasa después de inundar el crecimiento con una solución de yodo.

Battley y Bartlett reportaron que el método de Sacks presenta las inconveniencias de que se necesitan altas concentraciones de buffers para mantener apropiadamente los gradientes, y de

que el gradiente no permanece estable por más de dos días.

#### 18.4 Método de Zack.-

Este investigador propuso hacer un gradiente de pH, pasando una corriente eléctrica débil a través de un medio de agar; entonces los iones hidronio e hidroxilo emigran a los electrodos de carga opuesta produciendo un gradiente de pH.

#### 18.5 Método de Battley y Bartlett.-

Estos autores hicieron gradientes de pH en escalones en los 4 cuadrantes de cajas petri; colocaron en cada cuadrante, medio inoculado con un pH ligeramente diferente.

#### 18.6 Método de Halldal.-

Halldal estudió el crecimiento de las algas en gradientes cruzados de intensidad de luz y temperatura para lo cual hizo un aparato para producir tales gradientes.

#### 18.7 Método de Link.-

Link describió un método para demostrar el sinergismo entre dos agentes antivirales en una prueba de placa de gradiente. En una placa ino-

culada se colocan en forma de V, dos tiras de papel, cada una impregnada con un compuesto diferente. La interacción puede notarse a lo largo del área interna de la V, dado que la concentración de cada compuesto se reduce conforme aumenta la distancia entre las tiras.

#### 18.8 Método de Herrmann.-

Estudió la mutación de poliovirus según su resistencia a la guanidina usando frascos como placas. Para ello, se inclinan los frascos que contienen monocapas de células infectadas por virus las cuales después se cubren con medio de agar que contiene Guanidina a la concentración límite más baja; se deja solidificar el agar y después se colocan los frascos sobre una superficie plana; después se añade una capa de medio de agar con Guanidina a la concentración límite más alta.

Usando esta misma técnica se puede determinar la actividad de una variedad de sustancias antivirales contra diferentes virus.

En el aislamiento de bacterias de fuentes naturales en medios selectivos, el contenido de inhibidor de éstos puede ser demasiado alto para aislar el microorganismo deseado o demasiado bajo para evitar la proliferación de los contaminantes. Cuando se trabaja con



muchas muestras, no es posible hacer varias pruebas para cada una, por lo que el uso de placas de gradiente constituye una alternativa de miniaturización para encontrar la concentración de inhibidor en el medio selectivo, que permita el aislamiento.

Cabe decir que aún no se ha explotado todo el potencial de las placas de gradiente.

## 19. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE REACCIONES TEMPRANAS MEDIANTE ISOTOPOS RADIATIVOS.-

### 19.1 Método de Levin.-

Levin efectuó un trabajo sobre el desarrollo de pruebas rápidas para bacterias coliformes, usando medios de cultivo adicionados de isótopos radiactivos. El método consiste en adicionar un sustrato de  $^{14}\text{C}$  en el medio; se inocula en la forma usual y se incuba en un sistema que permita atrapar el  $^{14}\text{CO}_2$  producido para determinar su radiactividad. Levin fué el primero en usar este tipo de método para las determinaciones de rutina de cultivos bacterianos. El  $^{14}\text{CO}_2$  se detecta mucho más fácilmente que el gas acumulado en los tubos de Durham.

Esta técnica se ha usado también para estudiar la acción de compuestos antimicrobianos, midiendo su producción de  $^{14}\text{CO}_2$  cuando se incuban en presencia del agente. Levine y Watts usaron esta técnica para probar la actividad de la histidina-descarboxilasa.

Para atrapar el  $\text{CO}_2$ , se usa la modificación de Roth, para lo cual se forma un cilindro con una tira de 1 x 3 cm de papel filtro Whatman. El cilindro se sujeta firmemente con el extremo de un clip de alambre y lo que queda del clip se

endereza y se introduce a través del centro de la tapa de un bote de polietileno, de modo que el papel quede suspendido, hacia el interior del bote, sin tocarlo. El papel se sumerge en hidróxido de hiamina y se deja secar.

Para la prueba, se coloca la tapa sobre el bote que contiene la mezcla de reacción; se incuba y se para la reacción inyectando HCl 6 N por un costado del recipiente de polietileno; se sella el orificio del recipiente con cinta adhesiva y se deja media hora; después de ello, se abre el recipiente y se transfiere el papel filtro a un vial que contiene fluido centelleante para elusión y subsecuentemente se determina la radiactividad.

## 19.2 Método de MacLeod.-

MacLeod describió un método para detectar células viables. El cultivo se incuba con  $^{32}\text{P}$  - y se colecta sobre filtros de membrana para medidas de radiactividad. La incorporación de  $^{32}\text{P}$  - es proporcional a la cuenta de células viables.

## 20. MÉTODOS DE CULTIVO "IN VIVO"

### 20.1 Método de Metchnikoff.-

Metchnikoff fué probablemente el primero - en usar las técnicas de cultivo "in vivo" miniaturizadas, para resolver un problema práctico; - él observó que el vibrio del cólera ejerce sus efectos nocivos "in vivo" por la producción de - una toxina soluble; empleó dos sacos de colodión de 3-4 ml de capacidad, estériles y llenos con - medio de cultivo. En uno de los sacos inculó - células de *Vibrio cholerae*, muertas con cloroformo, y en el otro, un cultivo viable del patógeno. Después, cerró los sacos y fueron colocados y -- mantenidos en el peritoneo de cobayos. Los síntomas de cólera se presentaron solamente en los cobayos que contenían el saco con el cultivo via ble de *Vibrio cholerae*.

### 20.2 Método de Tsuji.-

Tsuji cultivó el bacilo tuberculoso en cámaras formadas con pequeños vidrios de reloj, cu bi er t a s con papel filtro y papel pergamino soste nidos en su lugar con una placa de plástico y un hilo. Se implantan de 6 a 8 cámaras de 2 x 2 cm dentro de la cavidad peritoneal de cada conejo.- En 4 días se alcanza el equilibrio entre el contenido de proteínas del suero del conejo y de la

cámara interior. Cuando se ha sustituido el papel pergamino por celofán, la difusión cruzada - se ha limitado al paso de sustancias de peso molecular relativamente bajo.

Bajo estas condiciones se ha logrado cultivar el bacilo tuberculoso de aves pero no el de bovino ni el del humano.

### 20.3 Método de Fina.-

La miniaturización también se ha empleado para estudios de la Microbiología de la panza de rumiantes, sólo que usando cámaras más grandes - que las que se implantan dentro de los tejidos.

Fina puso filtros pegados en conos para la salida de gases de fermentación y los insertó en la pared de la panza de rumiantes. Más tarde, - hizo algunas modificaciones, proponiendo diseños de acero inoxidable equipados con salidas de - - gas, en los que se podía acomodar una gran variedad de filtros de membrana, discos de cerámica, vidrio poroso, etc. Las membranas más frágiles se protegen mediante un enrejado de acero inoxidable.

### 20.4 Método de El-Shazly.-

El-Shazly también usó tubos de diálisis ligados en ambos extremos para efectuar investiga-

ciones en la panza de rumiantes. Los sacos se colocan en un cilindro protector formado por una rejilla de alambre o de plástico.

## 21. MÉTODOS DE INOCULACIÓN MÚLTIPLE.-

La Microbiología ha avanzado gracias al estudio cada vez más profundo de las actividades de los microorganismos y sigue necesitando de este tipo de estudios tanto para su desarrollo, como para su aplicación en beneficio del hombre.

En este campo, la miniaturización ha contribuido enormemente con dos de los principales desarrollos en la tecnología de esta ciencia.

Primero, se han producido una serie de procesos más veloces que las técnicas convencionales para el examen de las características y propiedades de los cultivos.

Segundo, los procesos se han adaptado para el estudio de números cada día más grandes de cultivos de microorganismos, utilizando los métodos de inoculación múltiple.

A través de la automatización es posible combinar estos dos desarrollos por lo que ahora se procesan grandes números de cultivos rápidamente.

## 21.1 MÉTODOS DE REPLICA EN PLACA Y MÉTODOS RELACIONADOS. -

### 21.1.1 Método de Lederberg y Lederberg. -

Estos investigadores utilizaron cuadrados de terciopelo de 12 cm de lado, -- los empacaron en cajas petri y los esterilizaron en autoclave; después colocaron un cuadrado con el pelo hacia afuera sobre una madera cilíndrica o un soporte de corcho de 9 cm de diámetro y lo sujetaron firmemente en ese lugar con una pestaña de metal ó con un aro. Posteriormente, -- invirtieron sobre la tela, una placa con agar que tenía las colonias iniciales, y ejercieron una presión digital ligera para transferir el crecimiento. En la tela quedó entonces el patrón para transferir una réplica del inóculo a placas subsecuentes.

El uso del terciopelo para hacer réplicas de placas se volvió muy familiar -- para la mayoría de los bacteriólogos. A partir de esta técnica se desarrollaron -- muchas otras, basadas en ella y ofreciendo diferentes ventajas según el caso. Es te método fué usado en algún tiempo para determinar la contaminación bacteriana de



las telas, poniéndolas en contacto directo con la superficie de agar.

#### 21.1.2 Método de Parry.-

Parry utilizó una forma de contacto directo para replicación en el estudio de la actividad bacteriostática de algunas cremas antisépticas. Su método utiliza unos botes de unos 3 cm de diámetro, llenos hasta el borde con agar estéril. Este medio se inocula por réplica colocando el bote directamente sobre la superficie de un medio de agar con varias colonias a probar. Una vez inoculado se cubre con papel seda y se le quita el exceso de humedad con papel filtro; se coloca la crema antiséptica sobre el papel seda y se deja así durante 1 a 2 horas para permitir que difundan los agentes bacteriostáticos de la crema hacia el cultivo, a través del papel de seda; luego se retira el papel con la crema y se incuban los botes.

Para determinar que la inhibición del desarrollo por el efecto de los antimicrobianos fué únicamente bacteriostática, se vuelven a replicar los botes sobre placas de agar.

### 21.1.3 Método de Harris.-

Harris combinó el método de gotita con el de terciopelo, en el cual se pone una placa de agar sobre un patrón que tiene marcados 25 puntos; después se cortan en el agar 25 discos con un tubo de vidrio estéril de 8 mm de diámetro; se invierte la placa y se quita el agar que rodea a los discos con un alambre estéril, quedando los discos adheridos a la placa. Se inoculan los discos con una gotita de un cultivo diferente para cada uno y después, utilizando el método del terciopelo, se transfieren esos cultivos a otras placas marcadas con patrones similares al de los discos.

Este método tiene la ventaja de que los discos están separados y entonces los productos metabólicos se quedan limitados en cada uno de los discos.

### 21.1.4 Método de Anagnostopoulos y Woodbine.-

La técnica del terciopelo se usó para estudiar la asimilación y utilización de ácidos orgánicos y aminoácidos; con este método se pueden inocular 5 ó 6 y hasta 10 placas a partir de una placa inicial.

Muchos investigadores, como Anagnos topoulos y Woodbine han hecho modificaciones del método que permiten la inoculación de números mayores de réplicas a partir de un sólo inóculo. Ellos idearon la replicación con presión controlada que permite la producción de 25 réplicas de una placa "madre", sin embarrar los fondos de las placas con sólo tener capas de medio de grosor uniforme. El replicador se usa para depositar células sobre la superficie de agar de cajas petri, en estudios sobre la resistencia al calor. También puede replicarse la placa inicial para hacer 5 ó 6 placas "madre", a partir de las cuales se inoculan series de placas.

#### 21.1.5 Método de Neal.-

El proceso de replicación fué semi-automatizado por Neal, quien arregló un bote tapado como instrumento para presionar. Este bote es de hierro galvanizado y tiene soldadas unas uñas de latón de 1.3 cm de largo, de modo que se inclina este instrumento sobre tubos con cultivos para tomarlos con las uñas y después inocular las placas.

### 21.1.6 Método de Watt.-

Watt describió un método de automatización, en el cual una caja petri se inserta dentro de una envoltura de perspex; accionando el microswitch de un motor se hace descender un brazo de inoculación -- con más de 28 alfileres inoculantes para sumergirlos en tubos llenos con inóculo; después se mueve el brazo hacia la caja petri, se hace descender para inocularla y se levanta. La placa se inocula en 6 segundos y después sale mecánicamente de la capucha de perspex. Una segunda placa inicia de nuevo el ciclo. Los alfileres inoculantes pueden ser substituídos por tubos de acero inoxidable conectados a un vacío múltiple.

La cantidad de inóculo que depositan los aparatos de inoculación puede controlarse y hacerse lo suficientemente precisa para que puedan efectuarse determinaciones cuantitativas miniaturizadas; en estos casos se emplean generalmente agujas de 2 mm de diámetro que depositan 0.0006 ml, por ejemplo.

Para verificar su precisión, el aparato se llena con colorante y se inocula

en placas de agar; después se disuelven los discos de medio en agua hirviente y se determina la concentración de colorante espectrofotométricamente.

#### 21.1.7 Método de Holliday.-

Holliday usó una pieza de zinc pesado, a la cual se le soldan por la parte superior, una agarradera y por la inferior, 25 tornillos. El instrumento se esteriliza sumergiéndolo en alcohol y flameándolo. Con ese instrumento se inocula una placa principal con medio de cultivo completo y después de obtener crecimiento, se inoculan con el replicador 12 placas de medio mínimo, cada una suplementada con 6 factores de crecimiento.

#### 21.1.8 Método de Massey y Mattoni.-

Hicieron un replicador confiable y fácil de operar, que consta de 25 pipetas Pasteur de cerca de 2 mm de diámetro exterior en la punta; las pipetas se sujetan en un estante formado por dos hojas de acero inoxidable montadas sobre un bloque de madera de 5 cm de espesor. Las hojas tienen orificios que en la superior son de 7 mm de diámetro y en la inferior de 3

mm. Se colocan en los orificios las pipetas Pasteur de 9 pulgadas de largo, y se sujetan verticalmente. El inóculo se pone en 25 tubos de 13 x 150 mm y se cargan las pipetas por capilaridad. Se inocula en placas previamente secadas durante 24 horas para evitar que se quiebre el agar durante la inoculación.

Los métodos descritos anteriormente presentan ciertas ventajas sobre el método del terciopelo, ya que se puede hacer un número grande de réplicas en tanto que con el método del terciopelo se replica un número limitado de una placa principal.

#### 21.1.9 Método de Haque y Baldwin.-

Ellos usaron replicadores que tenían alrededor de 7,500 alfileres, para asegurar que ninguna colonia sobre la placa "madre" quedara sin replicar.

Este tipo de replicador presenta dificultades de uso ya que las colonias pueden mezclarse dado la proximidad de los inóculos o puede dificultarse la diferenciación de colonias cercanas.

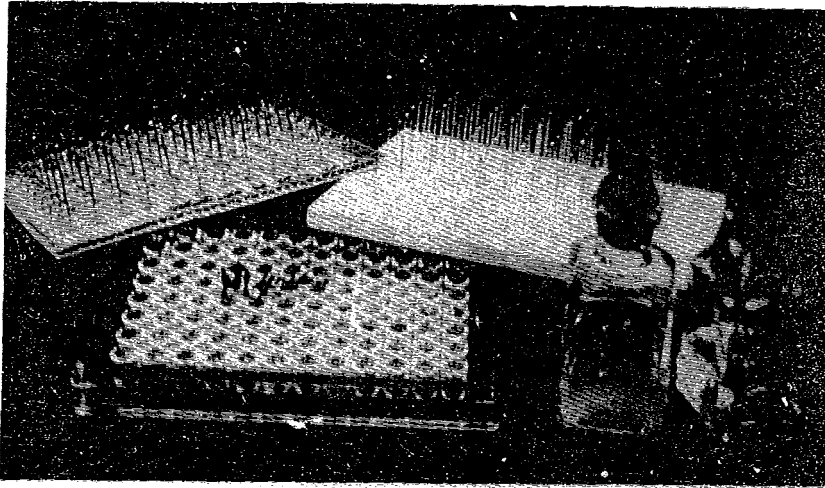
#### 21.1.10 Método de Mandell.-

Mandell estudió las mutantes de bacterias auxotróficas con un replicador que consta de 37 alambres de tungsteno de 2 pulgadas de largo, encajados en un bloque de plástico. Los alambres se esterilizan a la flama, se enfrían y luego se introducen dentro de una serie de pequeños viales que contienen los factores de crecimiento. Se pica con los alambres una placa de 9.5 cm de diámetro que contiene medio mínimo y el inóculo. Se incuban las placas toda la noche y se cubren con 10 ml de medio mínimo adicionado de 0.1% de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) y se incuban otras 2 ó 3 horas. Una respuesta positiva de crecimiento se observa como un punto púrpura alrededor del sitio de la picadura.

#### 21.1.11 Otros aparatos de inoculación con alfileres.

Uno de los factores más importantes en el desarrollo de las microtécnicas en placas o bandejas, ha sido el desarrollo de aparatos de inoculación múlt

tiple que permiten transferir cultivos de placas principales a medios sólidos ó líquidos.



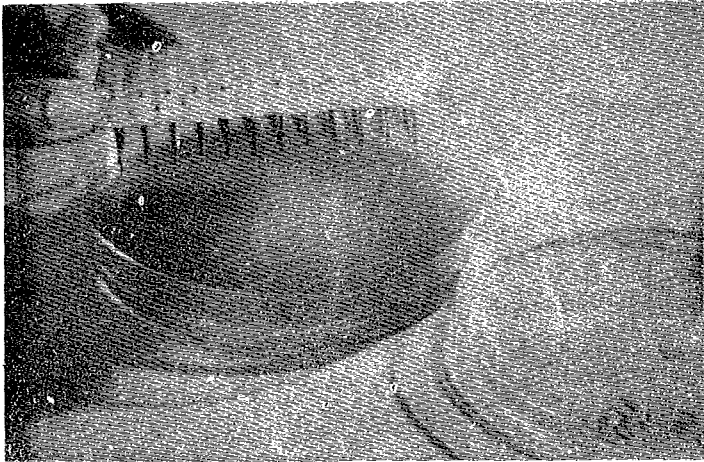
Estos aparatos, con cabezas ó puntas de alfileres salientes se hicieron inicialmente insertando alfileres de -- acero inoxidable de 27 mm de largo dentro de una plantilla de madera, plástico ó metal.

El aparato de cabezas de alfileres es el más adecuado para introducir cultivos a un medio líquido o para inocular superficies de agar planas, en -- tanto que el aparato de puntas de alfi-

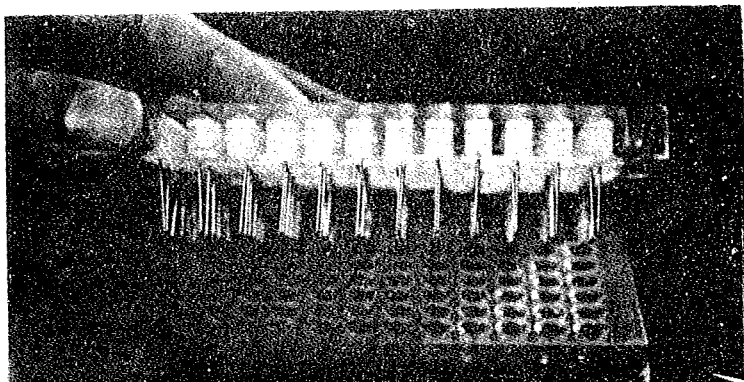


leres se usa para picaduras en medios sólidos ó semi-sólidos.

Los procesos de inoculación se -- llevan a cabo usualmente bajo una campana, mantenida previamente a un nivel de contaminación bajo con radiaciones ultravioleta. Los resultados de las pruebas preliminares indican que cada cabeza de alfiler libera cerca de 0.0006 ml y cada punta libera 0.0002 ml. El aparato ya cargado se utiliza como se observa en las siguientes figuras:



Inoculación de 96 cultivos sobre una - placa de agar. Esta placa fué secada - toda una noche a 37°C antes de ser ino- culada. Después se invierte y se incu- ba.



Inoculación de 96 cultivos dentro de me  
dios líquidos.

A continuación se describen algu-  
nas de las pruebas para las cuales se  
utilizan más los multi-inoculadores.

- 1.- Detección de Indol. Se llenan --  
los pozos con caldo triptofano, -  
después de un período de incuba--  
ción de 2 a 6 horas, se transfie--  
ren dos gotas de reactivo de Ko--  
vac a cada depósito con una pipe--  
ta Pasteur; si se forma una capa  
roja en la superficie del caldo,  
la prueba es positiva.

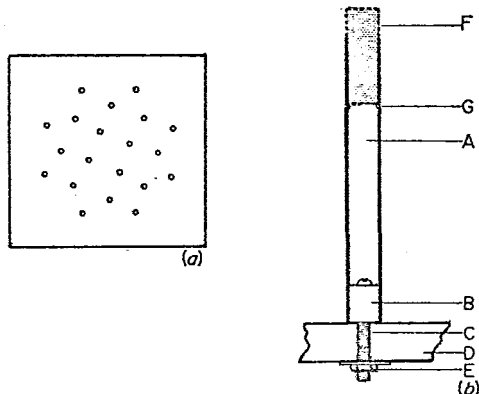
- 2.- Rojo de metilo. Se llenan los pozos de la placa de microtitula-  
ción con caldo MR-VP y se siem-  
bran con el aparato de inocula-  
ción múltiple de cabezas de alfi-  
leres; después de incubar se pone  
el reactivo de rojo de metilo en  
cada pozo. Una coloración roja ó  
rosa, indica una reacción positi-  
va.
- 3.- Prueba de Voges-Proskauer. A la  
placa ya inoculada e incubada se  
le añade en cada pozo una asada  
de alfa-naftol, seguida de una de  
KOH, con un asa de microtitulación  
de 0.05 ml de capacidad. Esta --  
técnica da los mejores resultados  
para detectar la presencia de ace-  
til-metil-carbinol. Una prueba -  
positiva se observa por la forma-  
ción de un color rojo ó rosa en -  
el pozo.
- 4.- Pruebas SIM. La producción de --  
 $H_2S$  e indol y la movilidad se pue-  
den probar con muy buenos resulta-  
dos mediante microinoculadores --  
con puntas de alfiler.

La producción de indol y la movilidad pueden detectarse en 8 horas y la producción de  $H_2S$  después de 12 horas de incubación.

#### 21.1.12. Método de Stewart y Widanapatirana.-

Estos investigadores consideraron que el replicador de terciopelo transfiere demasiado inóculo al medio de prueba, y entonces diseñaron un replicador en el cual se usaba espuma plástica para la inoculación.

La base del replicador es de perspex, mide 100 x 100 x 10 mm y tiene 20 horadaciones de 3.2 mm de diámetro, según el esquema (a) de la figura siguiente:



Con este arreglo queda una distancia de 14 mm entre los hoyos. El esquema (b) muestra el montaje del replicador. Los tubos replicadores son pipetas Pasteur con un calibre (B) los cuales están fijados a la base con unos tornillos de 25.4 mm de largo (C), cada uno asegurado por la parte inferior de la base (D) con una arandela y una tuerca (E).

Dentro del tubo replicador se inserta un tapón de espuma de polieter (F) de 8 mm de diámetro, previamente esterilizado en autoclave dentro de un bote cerrado. La constricción del cuello (G) de la pipeta permite que el tapón sobresalga por el extremo final del tubo.

El replicador se guarda invertido sobre un vaso de precipitados con alcohol para usarse, se flamea el extremo del tubo y después se inserta el tapón de espuma con ayuda de unos forceps estériles.

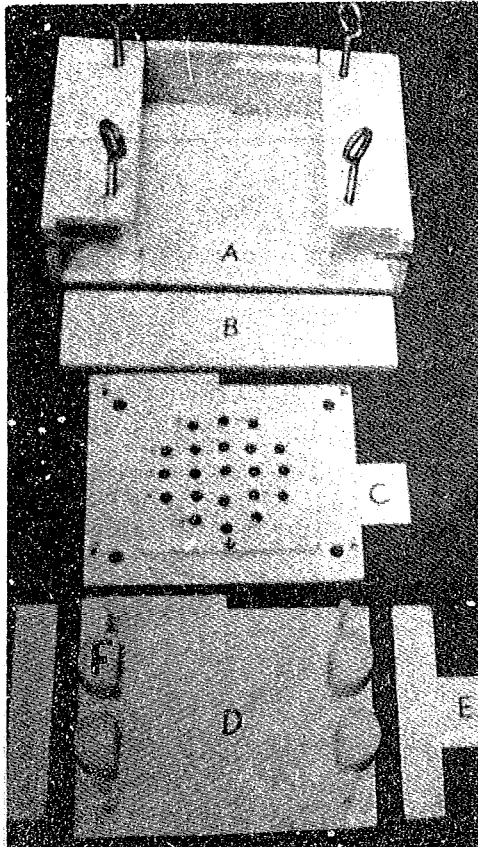
Con pipeta Pasteur estéril se coloca una gota de cada suspensión de mi-

croorganismos sobre un sitio ya asignado de una caja petri de plástico estéril, que se coloca sobre el patrón de los orificios mostrado en la figura (a). De este modo, la compresa de espuma del replicador queda alineada sobre las gotas, las cuales se absorben a la espuma al presionar ligeramente el replicador. Después el replicador cargado se presiona sobre la superficie de 30 medios de cultivo diferentes. Si se están usando más medios, puede volver a cargarse el replicador inmediatamente con un segundo "pool" de 20 gotas, previamente preparado en otra caja petri.

#### 21.1.13 Método de Kaneko y Franklin.-

Estos investigadores describieron un inoculador con múltiples jeringas, que permite inocular más de 100 placas en 15 minutos, con una reproductibilidad excelente, simplicidad de diseño, fácil construcción, costo mínimo y requerimientos de mantenimiento insignificantes.

El aparato consta de 6 componentes, como se muestra en la siguiente figura:



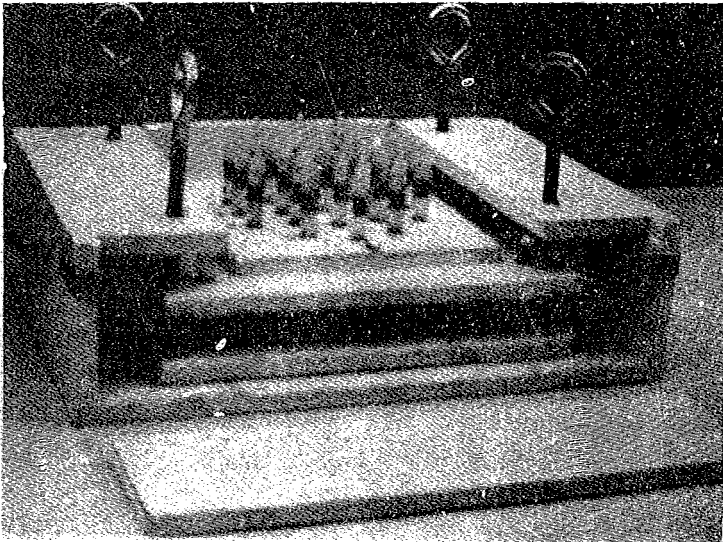
Los componentes de este inoculador son los-  
siguientes:

COMPONENTES	CLAVE	MEDIDAS (cm)		
		largo	ancho	alto
Soporte	A	25.5	36.0	10.5
Placa frontal de protección	B	1.6	34.5	7.8
Sujetador de jeringas	C	23.0	26.5	1.2
Placa de presión de las jeringas	D	23.0	26.5	1.2
Retenedores	E	21.5	3.5	1.2
Esponjas semi-circulares	F	-	-	3.6

Para armar el inoculador de Kaneko y Franklin, la placa de presión de las jeringas D se inserta dentro de la caja A. El sujetador de jeringas C se coloca sobre la placa D, de modo que los cuatro postes de las esquinas de esta última se ajusten dentro de los cuatro hoyos de la placa C. Las esponjas semi-circulares F sobre la placa D actúan como resortes. Las jeringas de 3 ml se sujetan en posición vertical con las puntas hacia arriba y los émbolos sobre la pla



ca D. Las pequeñas marcas negras, en los extremos de la placa C son marcas de presión hechas por los tornillos grandes que la sujetan. Los retenedores E se ponen en su lugar después de que se han hecho los ajustes iniciales con el tornillo de presión, de modo que todas las gotas sean de la misma medida. La placa B, actúa como un protector contra contactos accidentales con la placa C. El aparato se limpia con un de sinfectante, regularmente durante su uso, y ocasionalmente se esteriliza en autoclave.

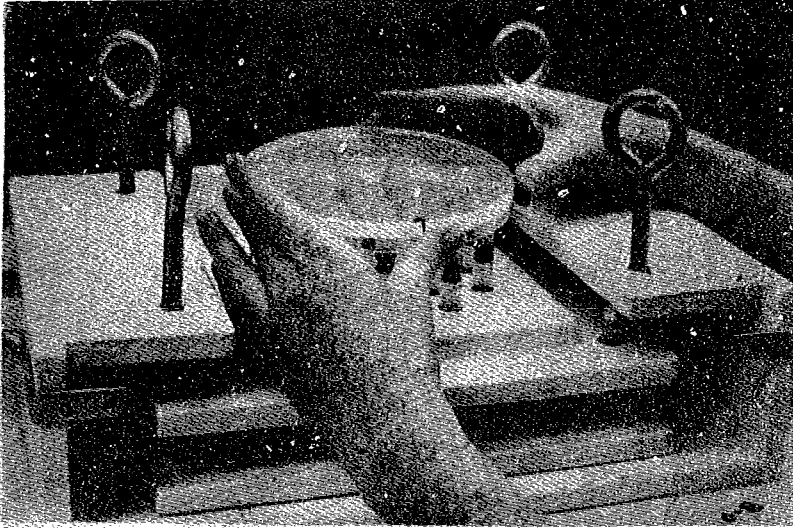


Inoculador de Kaneko y Franklin armado

Para efectuar la inoculación, se pone

una suspensión bacteriana en cada una de las jeringas de 3 ml; se les quitan las burbujas de aire y se insertan en uno de los orificios de la placa C. Se colocan en su sitio los retenedores C. La placa D se coloca sobre la cima de los émbolos de las jeringas, y se le aplica presión para liberar gotitas de las jeringas. La unidad formada por C, D y E, se invierte y se inserta dentro del soporte del inoculador A. Las dos piezas de madera E, se retiran cuidadosamente y la placa B se coloca al frente de A para sujetar el sistema. Las primeras gotitas se ajustan con los cuatro tornillos de presión colocados en las esquinas. La inoculación se lleva a cabo como se muestra en la siguiente figura: (Pág. 189).

Una de las ventajas de este método, es que la superficie de agar no es tocada por el inoculador, por lo que no es necesario flamear, enfriar ó sumergir repetidamente para esterilizar. Además, debido a la posición invertida de la placa durante la inoculación se reduce la contaminación por el aire, resultando ser un inoculador muy eficaz y seguro.



La caja petri que contiene el medio se sujeta sobre el inóculador; las gotas se recogen sin hacer contacto entre el inóculador y el agar.

#### 21.1.14 Método de Börje Lindström.-

Börje Lindström describió una nueva técnica para recoger las colonias bacterianas así como un nuevo tipo de replicación.

Todo el sistema consta de: unas perlas de vidrio, un aparato recogedor, un tamiz y un nuevo tipo de replicador.

El aparato recogedor mostrado en

la figura A(b), consiste en un tubo de vidrio ligeramente encorvado en la punta más estrecha y con un orificio lateral que puede conectarse a una fuente de vacío mediante un tubo de plástico.

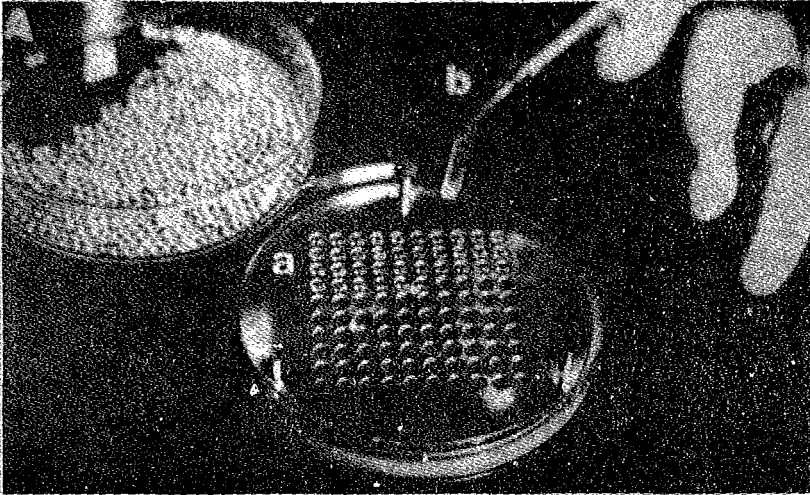
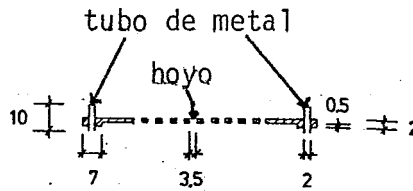


Fig. A

Con el aparato recogedor conectado al vacío se aspira una perla de vidrio - estéril para lo cual se tapa con un dedo el hoyo lateral del tubo. Luego se sumerge la perla en una colonia, e inmediatamente se transfiere a uno de los hoyos del tamiz, colocado sobre una placa de agar nutritivo. Cuando la parte de la perla que lleva el inóculo sale a través del tamiz y toca la superficie del agar

nutritivo, se destapa el hoyo lateral - del aparato, quitando el dedo para interrumpir el vacío. La perla se deja en el tamiz y el procedimiento se repite - con otras perlas de vidrio y otras colonias. El hoyo lateral del aparato -- permite al operador regular el vacío -- con la presión del dedo. Si el aparato recogedor se contamina, puede sumergirse en etanol y flamearse.

El tamiz de perlas mostrado en la figura A(a) de la página anterior, tiene 100 hoyos de 3.5 mm de diámetro, que acomodan perlas de vidrio de 3 mm de -- diámetro. Tiene tres patas de metal en la periferia, para fijarse a la placa - de agar nutritivo y permite sacar las - perlas, invirtiendo la placa. La parte inferior central del tamiz está excavada a un espesor de 0.5 mm para prevenir la formación de una película de humedad entre el tamiz y la superficie de agar nutritivo.



El tamiz puede acomodar 100 perlas sobre una placa individual. Después de que los cultivos deseados se han inoculado en la caja madre mediante las perlas inoculadas, éstas y el tamiz se quitan fácilmente, colocando la tapa de la caja petri sobre la placa inoculada e invirtiéndola. Como el tamiz tiene 3 patas medidas en el agar, se golpea suavemente sobre el fondo de la placa para quitarlo. Las perlas y el tamiz se esterilizan después lavándolos en etanol y flameándolos.

Con las colonias que aparecen en esta placa "madre" y usando el replicador descrito a continuación, se puede hacer un número enorme de réplicas de muy alta calidad.

El replicador requiere de una fuente de vacío que proporcione una succión uniforme sobre toda la superficie de la placa "madre" y en lugar de terciopelo -

se utilizan papeles filtros estériles y húmedos para dar una superficie tersa.

El replicador, como se observa en las figuras B y C está hecho de polivinilo y tiene 2 anillos del mismo material, uno para sujetar la tela soporte en su lugar y el otro para fijar el papel filtro de 9 cm.

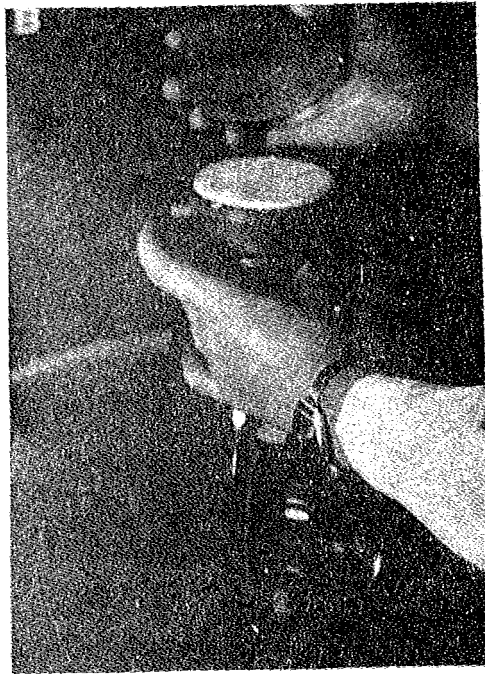


Fig. B

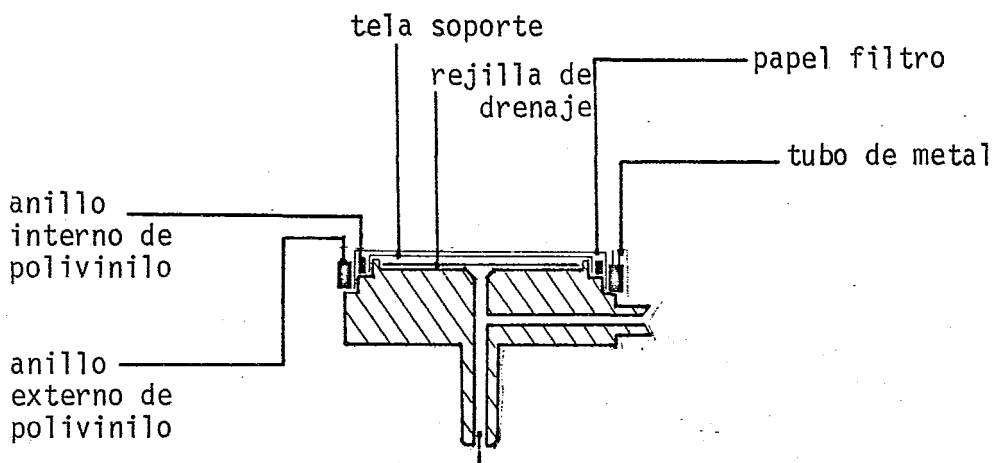


Fig. C

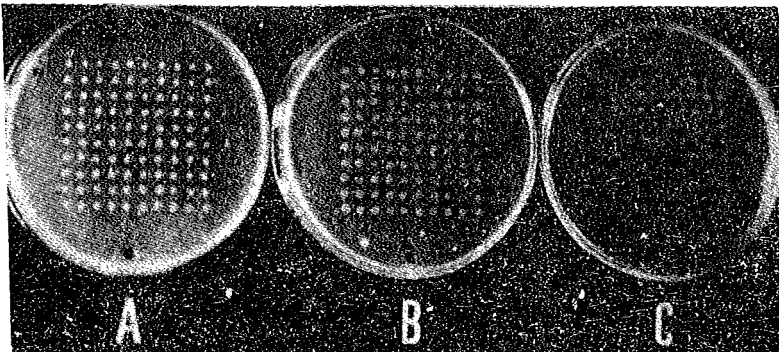
Primero se colocan dos papeles - filtros secos, de 7 cm de diámetro sobre la tela soporte del replicador, como se observa en la figura C, para absorber las trazas de humedad del papel filtro esterilizado de 9 cm. de diámetro y para prevenir una contaminación por la fuente de vacío. El papel filtro húmedo de 9 cm de diámetro se fija en su lugar con un anillo externo de polivinilo. Después se invierte la placa "madre" sobre el replicador y se hace un -



contacto uniforme aplicando una succión ligera, como se observa en la figura B; se elimina el vacío y se retira la placa "madre"; todas las colonias encontradas en la caja "madre" son transferidas al papel filtro; después para inocular las placas, se invierten sobre el replicador.

Unido al anillo externo de polivinilo, se encuentra un tubo metálico que automáticamente hace una marca de referencia en la superficie del agar, para mostrar la orientación de la placa "madre" y la de las réplicas.

El tamiz permite la inoculación de 100 colonias diferentes y se ha visto que la combinación de tamiz y replicador en un método dan resultados muy satisfactorios, como se observa en la figura:



En este ejemplo, se transfirieron colonias de *Escherichia coli* mediante perlas de vidrio y tamiz, a una placa - de agar nutritivo y se incubó a 37°C durante 4 horas; después se usó esa placa "madre" en el procedimiento de réplica descrito.

En esta figura las placas son:

- A. Placa "madre" después de 4 horas de incubación a 37°C.
- B. Placa principal después de la replicación y otras 5 horas de incubación a 37°C.
- C. Quinta réplica después de 5 horas de incubación a 37°C.

Por supuesto, el tiempo de incubación, depende de los rangos de crecimiento de las bacterias empleadas en el experimento.

Este tipo de replicador da excelentes resultados pudiendo efectuarse - aproximadamente 20 réplicas sucesivas.

También con este método, es posible replicar colonias muy pequeñas, ade

más de que raramente se observan colonias embarradas unas con otras por lo que este método puede ser muy útil en Microbiología.

## 21.2 MÉTODOS DE DILUCION CON ASA, PIPETAS GOTERAS Y OTRAS COSAS PARA TRANSFERENCIA DE CULTIVOS.-

### 21.2.1 Método de Berridge.-

Berridge utilizó un método de inoculación para hacer transferencias rápidas, que consiste en tener un cilindro de platino de 3 mm de largo y 2 de diámetro, con paredes de 0.2 mm de espesor, soldado a un alambre de platino de 0.5 mm de diámetro en un ángulo recto con el eje del cilindro; este dispositivo es más exacto y requiere menor habilidad en su uso que el asa estándar de 0.01 ml.

Las asas estándar ó calibradas se han usado por mucho tiempo en bacteriología de la leche, para hacer diluciones ó para inocular tubos, botes ó placas. Su uso genera resultados menos exactos que los obtenidos con pipetas, pero salva el problema de tener que hacer diluciones, lo cual consume tiempo. La estan

darización de estos métodos, en todos sus detalles es muy importante; por ejemplo, la cantidad de muestra recogida por un asa depende del ángulo. A  $28^\circ$  el asa actúa como una cuchara y translada más muestra que cuando se saca en un ángulo de  $90^\circ$ .

### 21.2.2 Método de Takátsy.-

Takátsy diseñó un asa espiral -- que se flamea para esterilizarla y se enfría antes de ponerla en contacto con la superficie de un fluido, el cual -- llena el espacio encerrado por el -- espiral y se mantiene ahí por la tensión superficial; de esta manera, se pueden transferir volúmenes relativamente -- grandes (0.025 a 0.2 ml) de fluido.

Este tipo de asas ha sido muy -- usado para hacer diluciones en estu- -- dios serológicos y virológicos, así co -- mo para la transferencia rápida de pa- -- ramecios para su observación en el mi -- croscopio.

### 21.2.3 Método de Cook y Yousef.-

Ellos usaron agujas hipodérmicas sobre las pipetas para gotear. Se podían usar diferentes medidas de agujas

para obtener una variedad en las medidas de la gota. También diseñaron un aparato para sujetar varias pipetas de goteo para hacer inoculaciones múltiples.

#### 21.2.4 Método de McGuire.-

McGuire utilizó palitos aplicadores para transferir el inóculo de tubos de fermentación primarios a tubos de -- confirmación, en pruebas como el análisis de coliformes del agua. Se introduce un palito dentro del tubo primario de fermentación, se retira y luego se sumerge en el fondo de un tubo confirmativo; se agita suavemente y se desecha el palito.

En comparación con las pipetas y asas, los aplicadores dan el número más alto de confirmaciones en la transferencia de inóculo; por otro lado, con palitos ó con pipetas las transferencias se hacen en la mitad del tiempo requerido para hacerlas con asas. Los palitos también son adecuados para la transferencia de colonias de una placa a otra.

### 21.3 MÉTODOS DE TUBOS Y BANDEJAS.

Muchos de los métodos descritos en la sección 21.1 pueden utilizarse en la inoculación de tubos y bandejas, por lo que en esta sección se mencionarán algunas técnicas adicionales para el manejo de números grandes de cultivos.

#### 21.3.1 Método de Goodfellow y Gray.

Ellos usaron una placa de aluminio con 25 perforaciones en cada una de las cuales se pone un vial de fondo plano. Los viales llenos con medio sólido o líquido se inoculan con una serie de 25 cultivos diferentes con un inoculador multipuntos. Para detectar el gas, se cubre el agar con un cuadro pequeño de vidrio o de plástico que mida de 4 a 6 mm ó con un disco para atrapar burbujas.

#### 21.3.2 Método de Koch y Kaplan.

Ellos construyeron una placa de plástico con 25 cavidades, la cual se ajusta en el fondo de una caja petri.

Para efectuar determinaciones de sensibilidad al antibiótico, se ponen

0.05 ml de una solución de la sustancia en cada cavidad y se seca la placa. Las placas ya secas se pueden almacenar por períodos largos de tiempo, y para realizar la prueba se ponen 0.2 ml de caldo de cultivo con aproximadamente  $10^5$  bacterias/ml en cada cavidad; se incuba la placa y se leen los resultados.

#### 21.3.3 Método de Quadling y Colwell.-

Estos investigadores describieron un aparato de inoculación simultánea para series de tubos de cultivo; consiste en una placa con 60 agujas de 4 pulgadas de largo y 3/16 de grueso, alineadas con los tubos de cultivo; los tapones de los tubos se levantan todos a un mismo tiempo para que las agujas ya cargadas inoculen el medio líquido ó semi-sólido. Para enjuagar las agujas se usan unos tubos intermedios con solución estéril.

#### 21.3.4 Método de Beargie.-

Beargie miniaturizó el método de dilución en tubo para determinar la susceptibilidad de las bacterias a antibióticos; usó placas con lunares en lugar de tubos de ensayo. Las diluciones del

antibiótico hechas en el medio de cultivo líquido, se ponen en las depresiones y después se inocula. Se cubre la placa con una envoltura de plástico que se presiona alrededor del borde de cada depresión; se incuba 18 horas a 37°C y se leen los resultados.

Este método es de igual exactitud y más rápido y económico que el método de dilución en tubo.

Las bandejas de vidrio ó de plástico -- grandes con muchas cavidades han sido muy útiles en estudios serológicos, ya que las diluciones seriadas se pueden hacer muy rápidamente, reduciendo los problemas del manejo de materiales.

Rutinariamente se utilizan placas de microtitulación con 96 cavidades, a las cuales se les ponen 0.2 ml de medio de cultivo. Se usan cubiertas para evitar la contaminación y retardar la evaporación durante el almacenamiento e incubación de las placas. Para observar los resultados se busca la aparición de turbidez.

Por ejemplo, cuando se inoculan las cavidades con cultivos de *Staphylococcus aureus* ó de *Escherichia coli* usando de 0.05 a 0.2 ml, se observa una turbidez definitiva en tan sólo



2 horas de incubación a 37°C. Conviene usar 0.2 ml, pues aunque los volúmenes menores dan turbidez en menos de 2 horas, también presentan más fácilmente los problemas de evaporación.

Como se muestra en la siguiente tabla, el crecimiento visible ocurre mucho más rápidamente en los depósitos de placas de microtitulación que en volúmenes más grandes de medio en tubos de ensayo.

Recipiente de cultivo	Volumen (ml)	Tiempo (horas)						
		0	1	2	3	4	8	20
Pozos de una placa de microtitulación	0.05	<u>+</u>	<u>+</u>	+	++	++	++	++
	0.10	<u>+</u>	<u>+</u>	+	++	++	++	++
	0.15	<u>+</u>	<u>+</u>	+	++	++	++	++
	0.20	-	<u>+</u>	<u>+</u>	+	++	++	++
	0.25	-	<u>+</u>	<u>+</u>	+	++	+	++
	0.30	-	<u>+</u>	<u>+</u>	+	+	+	++
Tubo de ensayo	0.50	-	-	-	<u>+</u>	+	+	++
	1.00	-	-	-	-	+	+	++
	5.00	-	-	-	-	<u>+</u>	+	++
	10.00	-	-	-	-	-	<u>+</u>	++

- Turbidez no visible

+ Turbidez ligera

+

++ Muy turbio

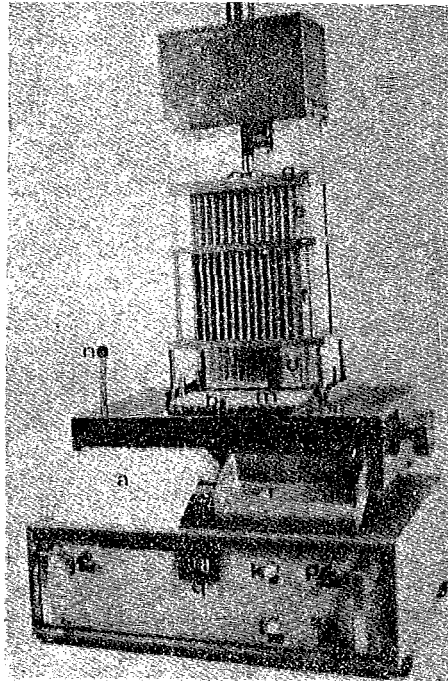
Para llenar las placas puede usarse una variedad de pipetas automáticas y para efectuar las pruebas de carbohidratos se pone, después - de la inoculación una capa de mezcla en partes iguales de aceite mineral-Amojell (aceite americano); esta capa sirve para dar condiciones adecuadas para la fermentación para atrapar el gas, ya que reduce la permeabilidad al oxígeno y no provoca inhibición del crecimiento.

#### 21.3.5 Método de Guinée y Hansen. -

Estos investigadores utilizaron - una microtécnica mecanizada para la tipificación serológica de cultivos de -- *Escherichia coli*; diseñaron un gotero - múltiple que consiste esencialmente de 120 jeringas de acero inoxidable sujetadas verticalmente en un armazón especial, de modo que las agujas queden en la mitad de los pozos. Este aparato, - puede distribuir 120 antisueros diferentes dentro de los 120 pozos de una bandeja.

Para llenar primero las jeringas se coloca el bloque (a) de la figura de la página siguiente, el cual tiene 120 reservorios de 2.5 ml, sobre la placa -

base (b). Después, la placa base y el bloque se levanta con la manija (c) y entonces las agujas (d) se sumergen en el fluido, mientras que los émbolos (e) de las 120 jeringas (f) están conectados a una placa transversal (g), la cual puede levantarse o bajarse por medio de 2 motores eléctricos (h) que están en la cima del aparato. Los motores son operados con un switch principal (j) y dos botones para movimientos hacia arriba (k) y hacia abajo (l).



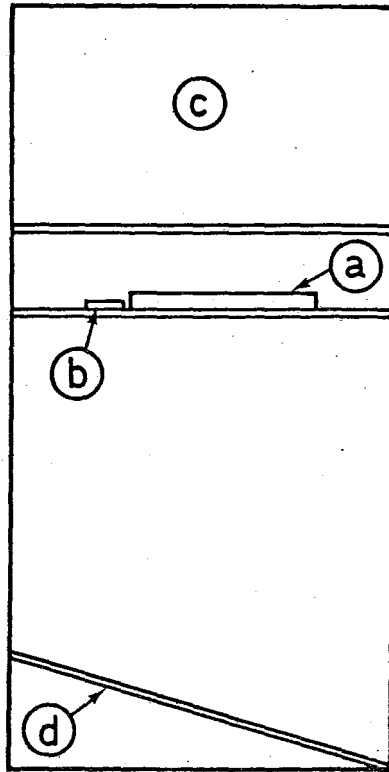
Gotero múltiple de Guineé y Hansen.

Después de haber llenado las jeringas se coloca una bandeja (m) sobre la placa base (b), se levanta y se coloca en la posición adecuada con la palanca (n), quedando el fondo de los pozos a 2 mm de la punta de las agujas, por lo que las gotas formadas en las puntas fluyen dentro de los pozos.

Se oprime el botón de inicio (p) y se baja la placa transversal para que cada jeringa libere una dosis igual, de 0.05 ml. Después, la bandeja se reemplaza por una vacía y se repite la operación. Las jeringas se limpian colocando un reservorio (r) sobre la placa base, de 500 ml con solución salina fenolada al 0.5% y 1% de glicerol para lubricación.

Después de llenar las bandejas con los antisueros mediante el gotero múltiple, se les añaden con pipeta 0.05 ml de la suspensión del antígeno, o sea del cultivo por identificar, previamente teñido con violeta de genciana para facilitar la lectura de las aglutinaciones; se incuba toda la noche a 37°C y después se observan las aglutinaciones

mediante la "caja de lectura" mostrada en este esquema.



En esta caja, se coloca la bandeja (a) sobre una plataforma transparente -- (b) en donde está escrita la tabla de -- los sueros en una forma inversa. La -- fuente de luz (c) proyecta las reaccio-- nes en el espejo inclinado (d).

Si las aglutinaciones son positi--

vas se titulan entonces con el autotítu-  
lador II de Canalco programado para di-  
luir el antisuero de 1:10 a 1:5,120. --  
Los antígenos se adicionan con una pipe-  
ta.

Esta microtécnica muestra varias  
ventajas con respecto a los métodos con-  
vencionales, ya que por ejemplo se re-  
quiere una cantidad muy pequeña de anti-  
sueros y antígenos, un menor espacio en  
el laboratorio y menor tiempo.

#### 21.3.6 Método de McComb y Puzniak.-

Estos investigadores utilizaron -  
placas de microtitulación de 96 pozos -  
para el aislamiento de *Chlamydia tracho-*  
*matis* de conjuntivas infectadas.

En los métodos convencionales se  
utilizan cubreobjetos redondos de 12 a  
13 mm de diámetro, y tubos de ensayo in-  
dividuales, por lo que el manejo de un  
número grande de tubos al mismo tiempo  
es limitado en la etapa de centrifuga--  
ción. Es por esta causa que se pensó -  
en hacer los aislamientos primarios de  
*Chlamydia trachomatis* en placas de mi--

crotitulación de 96 pozos, pre-esterilizadas, conteniendo células BHK-21 en monocapa sobre cubreobjetos redondos de 5 mm. Se pueden efectuar 384 pruebas (4 x 96) en cada centrifugación utilizando este método de microcultivo celular.

#### 21.3.7 Método de Wilkins y Walker.-

Estos investigadores desarrollaron un micrométodo para la identificación de 48 bacterias anaeróbicas en placas de microtitulación, basándose en su patrón de fermentación de carbohidratos.

Los carbohidratos que ellos prueban son: almidón, amigdalina, arabinosa, celobiosa, esculina, fructosa, glucosa, glucógeno, inositol, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melobiosa, rafinosa, ribosa, salicina, sorbitol, sacarosa y xilosa.

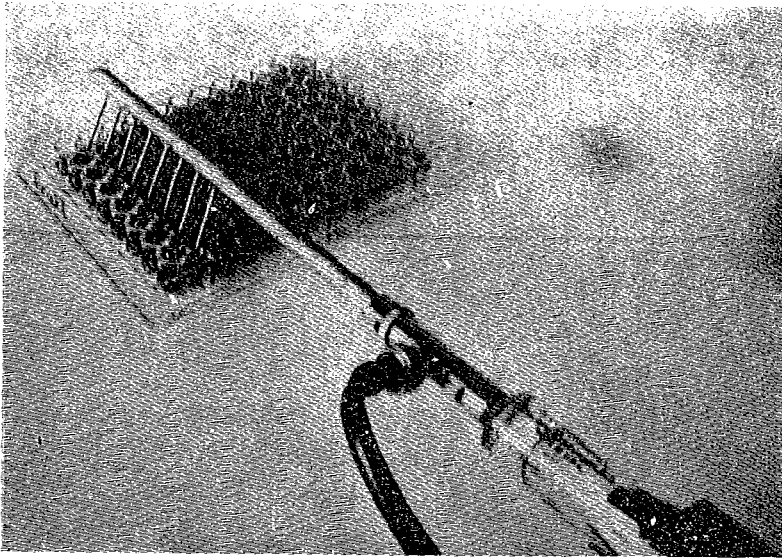
Primero se distribuye el medio de cultivo a 70-80°C adicionado del sustrato, en los pozos de las placas de microtitulación, mediante una jeringa automática de 5 ml, conectada a un distribuidor que tiene 8 salientes para llenar una fila de 8 pozos, con 0.25 ml de me-

dio en cada uno, como se observa en la figura de la página siguiente.

Después se incuban las microplacas durante toda la noche a 37°C, para verificar la esterilidad y para secarlas ligeramente; antes de inocularlas se meten en una cámara anaeróbica. Se inoculan las placas con los cultivos ya crecidos a probar; después se cubren con una tapa de plástico estéril para reducir la contaminación cruzada de los pozos, asegurándola con cinta adhesiva; se perfora la porción de la tapa correspondiente a cada pozo con la punta de un alfiler para permitir el escape de los gases producidos durante la fermentación. Se colocan las placas una sobre otra en una cámara anaeróbica y se incuban a 37°C durante 3 días.

La fermentación se detecta con un indicador colorido como rojo de fenol al 0.2% ó con un pequeño electrodo para medir el pH. Este método tiene un 97% de seguridad en la reproductibilidad además de ser muy económico, por lo que resulta muy útil para los laboratorios que necesitan identificar un número grande de anaerobios a un mismo tiempo.





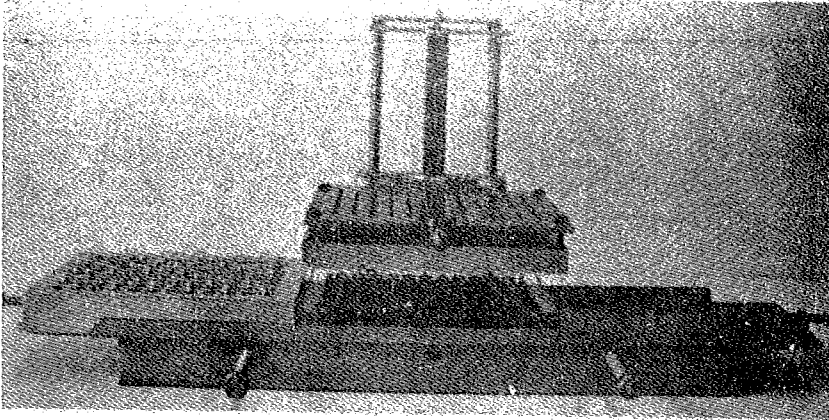
Jeringa automática de Wilkins y Walker

El replicador utilizado para la transferencia de 48 cultivos de bacterias anaeróbicas en una placa de microtitulación fué diseñado también por Wilkins y Walker, y presenta las siguientes ventajas:

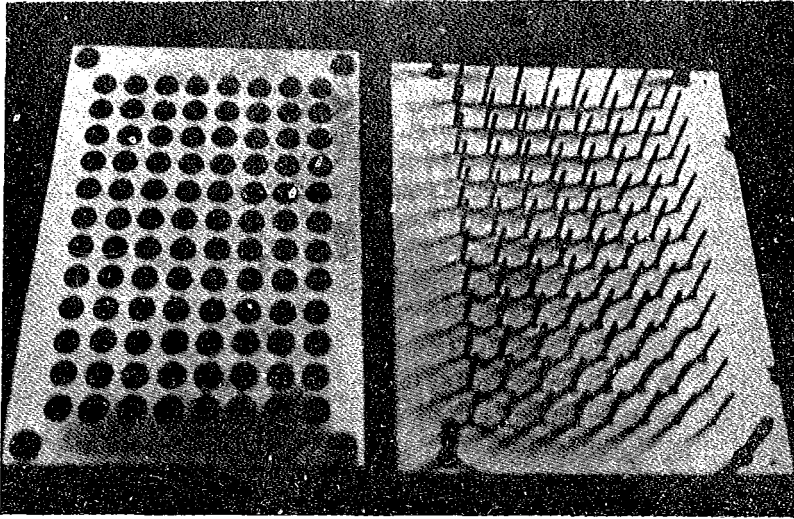
- es pequeño y apropiado para usarlo dentro de una cámara anaeróbica.
- es lo suficientemente simple y estable para ser operado fácilmente.
- es capaz de inocular el agar por picadura en lugar de hacer una inoculación superficial.
- tiene un grado bajo de contaminación
- puede esterilizarse fácilmente.

En la siguiente figura, se mues--

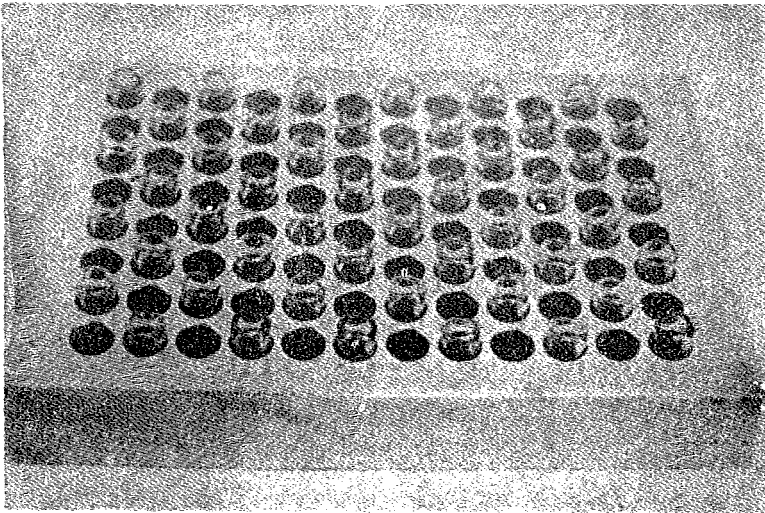
tra el replicador completo, visto de -  
frente:



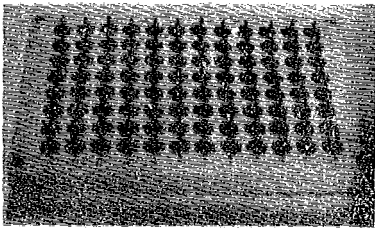
El replicador tiene una cabecera  
con 96 clavitos como se observa en la -  
parte derecha de la siguiente figura. -  
Se carga con el inóculo introduciendo -  
cada clavito en un cultivo bacteriano -  
distinto.



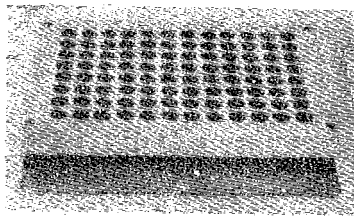
Los cultivos se encuentran en los tubos de vidrio de la placa principal mostrada en la siguiente figura:



Para cubrir los clavitos se usa - la placa-escudo que se muestra en las - siguientes figuras; este escudo inter--viene sólo cuando los clavitos no son empujados dentro de los tubos de inóculo ó dentro de los pozos con agar; sirve para evitar la contaminación de un clavo a otro, para asegurar un alineamiento exacto de la cabecera con los tu bos de inóculo y con los pozos de las - placas.



Vista de la placa-escudo unida a la cabecera; los clavitos se prolongan fuera de la placa.

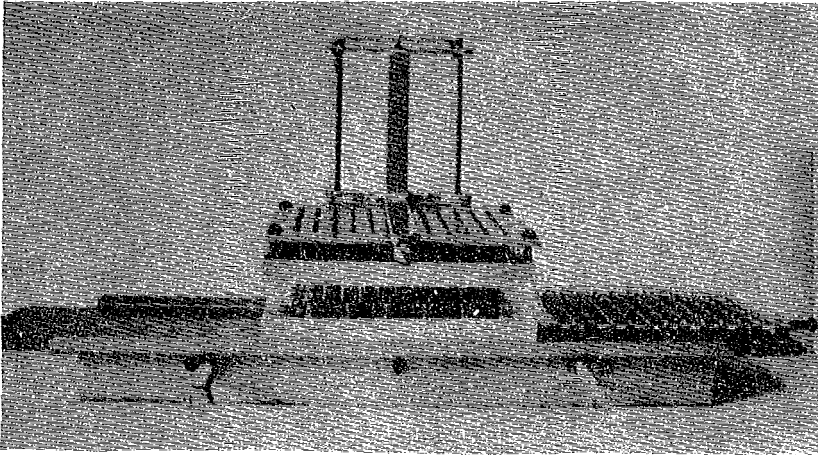


Vista de la placa-escudo unida a la cabecera; los clavitos están cubiertos por la placa.

El proceso general se lleva a cabo dentro de una cámara anaeróbica. Se - prueban 48 cultivos al mismo tiempo, dejando 48 pozos sin inocular como controles de esterilidad del medio.

Mediante el uso de pipetas Pasteur se llenan los 48 tubos con los inóculos, y se usa una tapa de plástico estéril para cubrir la placa principal -- cuando no se estén llenando los tubos.

La alineación exacta de la cabezera y la placa principal que contiene -- los tubos de inóculo, se lleva a cabo -- insertando una placa de microtitulación sobre cada lado de la placa principal -- sobre la bandeja del replicador y se -- ajusta su posición mediante tornillos -- encontrados en los extremos de la bandeja; con ésto quedan alineados lateralmente los componentes del aparato. El alineamiento del frente con la parte -- posterior se logra ajustando los dos pasadores que corren a lo largo de la base y que están unidos al fondo de la -- bandeja. Después de que las placas han sido alineadas, se procede a la inoculación, para lo cual se pone sobre la bandeja del replicador y a la derecha de -- la placa principal, una placa que contenga el medio de cultivo, como se observa en la siguiente figura:



La placa principal se empuja firmemente contra la placa del medio de cultivo y la cabecera del replicador se baja lentamente para cargar los clavos con inóculo. La placa a ser inoculada se usa para empujar la placa principal contra el tornillo de ajuste del otro extremo de la bandeja, quedando así alineada la placa de medio para la inoculación. Se baja suavemente la cabecera hasta que la placa escudo haga contacto con la placa de prueba y luego se acaba de bajar la cabecera para empujar los clavos dentro de los pozos. Este procedimiento se repite para cada substrato a probar.

Este tipo de replicador puede utilizarse para muchos otros procedimientos que necesiten inoculaciones múltiples repetidas y también puede utilizarse aeróbicamente, lo cual resulta ser más fácil.

#### 21.3.8 Método de Stargel, Thompson, Phillips, Lombard y Dowell.-

Estos investigadores utilizaron discos de papel impregnados con un substrato bioquímico, como una microtécnica para la caracterización de bacterias anaeróbicas.

Estos discos se colocan dentro de los pozos de una placa de microtitulación y se inoculan con 0.05 ml de una suspensión celular. En los discos de urea y de  $H_2S$  se adicionan 0.1 ml de aceite mineral estéril.

Se colocan las placas inoculadas en una jarra GasPak ó en una cámara anaeróbica con un alto grado de humedad para evitar que se sequen los discos. Los resultados se reportan después de 48 horas de incubación; el cambio de color de los discos se compara con la reacción de color estándar y si el disco está incoloro a causa de la reducción del indicador por el cultivo, se ponen de 1 a 2 gotas de solución acuosa de rojo de fenol al 0.025% para permitir la detección de acidez.

La reducción de nitratos se prueba, añadiendo 1 ó 2 gotas de reactivo A para nitratos (ácido acético-sulfanílico) y 1 ó 2 gotas de reactivo B para nitratos (dimetil-alfa-naftilamina) al disco con medio de nitratos.

Al disco con medio SIM para la detección de indol y  $H_2S$ , se añaden 4 gotas del reactivo de Kovac para detectar la -



presencia de indol.

Para probar la descomposición del peróxido de hidrógeno, se adiciona  $H_2O_2$  al 3% en un pozo que contiene suspensión celular.

Una de las principales ventajas de este sistema es su flexibilidad y versatilidad para utilizar una gran variedad de substratos; de hecho este método se utiliza con magníficos resultados para efectuar las siguientes pruebas: indol, producción de  $H_2S$ , hidrólisis de esculina, reducción de nitratos, catalasa, y fermentación de: arabinosa, glicerol, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, sacarosa, salicina y xilosa.

El 93.8% de los resultados obtenidos concuerdan con los de pruebas convencionales y solamente las pruebas de indol  $H_2S$  y reducción de nitratos concuerdan en un 90%.

#### 21.3.9 Método de Rowe, Todd y Waide.-

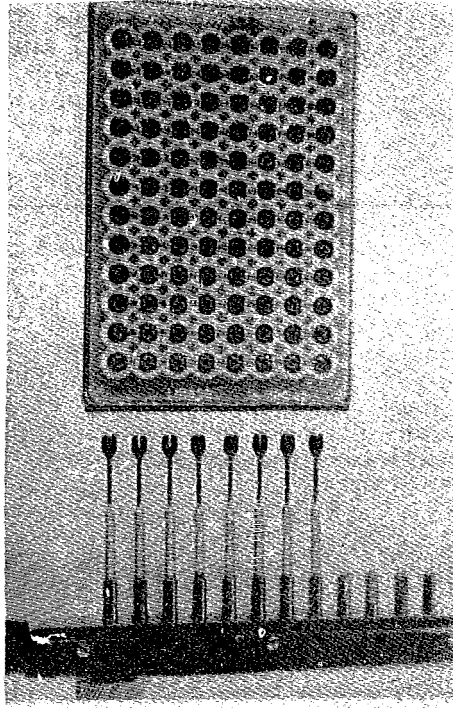
Estos investigadores utilizaron una microtécnica para determinar el número más probable de microorganismos del suelo.

que oxidan al amoníaco.

Se coloca una alícuota de 0.05 ml - de medio de amoníaco-carbonato de calcio dentro de cada uno de los pozos de una mi croplaca estéril de 8 x 12 pozos.

Posteriormente, se hacen diluciones seriadas con asas calibradas que liberan 0.05 ml. Las asas se colocan dentro de - los 8 pozos previamente inoculados, se gi ran rápidamente y se pasan a los siguientes 8 pozos en donde otra vez son girados rápidamente. Esta operación se repite -- hasta completar la serie de diluciones en toda la placa. El resultado son 12 di luciones seriadas cada una con la mitad de la concentración de su antecesora, con - ocho réplicas de cada dilución.

Después se cubren las placas con -- una tapa de polipropileno y se incuban du rante 3 semanas. Al término del período de incubación, se colocan las placas en - un cuarto a temperatura ambiente y se les añade un indicador (difenilamina al 0.2% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado) para probar la presencia de nitratos y/o nitritos. Un co-- lor azul en la reacción indica que se han formado estos productos finales y por lo



Microplaca con asas calibradas de dilución

tanto, los pozos que lo presentan se consideran positivos.

Las tablas de NMP para esta técnica utilizan tres datos:  $P_1$ ,  $P_2$  y  $P_3$  que indican:

$P_1$  = el número de pozos positivos - en la mayor dilución en la - - cual todos los pozos son positivos ( $P_1 = 8$ ) ó el número de pozos positivos en la dilución con el mayor número de pozos positivos.

$P_2$  = el número de pozos positivos en la dilución siguiente a la de  $P_1$ .

$P_3$  = el número de pozos positivos en la dilución siguiente a la de  $P_2$ .

Con la combinación  $P_1$ ,  $P_2$  y  $P_3$  se busca en las tablas el NMP para la muestra y el dato obtenido se multiplica por el factor de dilución de la fila de  $P_2$ ; como cada dilución representa la mitad de la anterior, los factores de dilución (inversos de las diluciones) son:

2	para la primera fila
4	para la segunda fila
8	para la tercera fila
16	para la cuarta fila
32	para la quinta fila
64	para la sexta fila
128	para la séptima fila
256	para la octava fila
512	para la novena fila
1024	para la décima fila
2048	para la undécima fila
4096	para la duodécima fila

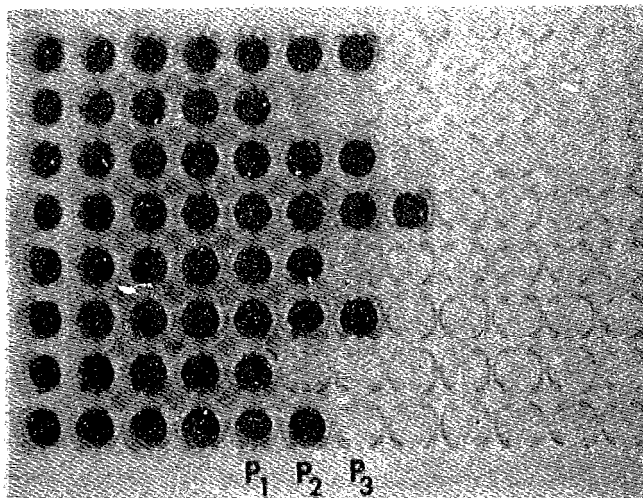
Finalmente, como el volumen de inóculo empleado en cada caso es de 0,05 ml, se multiplica por 20 para obtener el número más probable por ml de la suspensión original.

Por ejemplo, en la siguiente figura tenemos que:

$$P_1 = 8$$

$$P_2 = 6$$

$$P_3 = 8$$



dilución

El factor de dilución correspondiente a la fila de  $P_2$  (6a. fila) es 64.

Se busca en la tabla el NMP para 8 6 4 que es 1.565 como se observa en la tabla puesta a continuación.

TABLA DE NUMEROS MAS PROBABLES

P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	NMP	error estandar	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	NMP	error estandar
1	0	0	0.037	1.000	6	1	4	0.570	0.311
2	0	0	0.077	0.708	6	1	5	0.635	0.299
2	0	1	0.117	0.578	6	2	0	0.397	0.361
2	1	0	0.118	0.578	6	2	1	0.455	0.342
2	1	1	0.160	0.501	6	2	2	0.515	0.326
3	0	0	0.121	0.579	6	2	3	0.579	0.312
3	0	1	0.163	0.502	6	2	4	0.645	0.300
3	0	2	0.206	0.449	6	2	5	0.715	0.289
3	1	0	0.165	0.502	6	3	0	0.462	0.342
3	1	1	0.208	0.499	6	3	1	0.524	0.326
3	1	2	0.253	0.411	6	3	2	0.589	0.312
3	2	0	0.210	0.450	6	3	3	0.657	0.301
3	2	1	0.256	0.411	6	3	4	0.728	0.290
3	2	2	0.302	0.381	6	3	5	0.803	0.281
4	0	0	0.168	0.502	6	4	0	0.533	0.327
4	0	1	0.213	0.450	6	4	1	0.599	0.313
4	0	2	0.259	0.411	6	4	2	0.668	0.301
4	0	3	0.306	0.382	6	4	3	0.742	0.291
4	1	0	0.216	0.450	6	4	4	0.818	0.282
4	1	1	0.262	0.412	6	4	5	0.901	0.275
4	1	2	0.310	0.382	6	5	0	0.608	0.314
4	1	3	0.360	0.358	6	5	1	0.680	0.302
4	2	0	0.265	0.412	6	5	2	0.755	0.292
4	2	1	0.314	0.382	6	5	3	0.835	0.283
4	2	2	0.365	0.358	6	5	4	0.919	0.276
4	2	3	0.416	0.338	6	5	5	0.101	0.269
4	3	0	0.318	0.382	7	0	0	0.347	0.386
4	3	1	0.369	0.358	7	0	1	0.404	0.362
4	3	2	0.422	0.339	7	0	2	0.463	0.343
4	3	3	0.477	0.322	7	0	3	0.525	0.327
5	0	0	0.221	0.451	7	1	0	0.410	0.363
5	0	1	0.269	0.412	7	1	1	0.470	0.343
5	0	2	0.319	0.383	7	1	2	0.534	0.327
5	0	3	0.370	0.359	7	1	3	0.601	0.314
5	0	4	0.423	0.339	7	1	4	0.671	0.302
5	1	0	0.272	0.413	7	1	5	0.746	0.292
5	1	1	0.323	0.383	7	2	0	0.478	0.343
5	1	2	0.375	0.359	7	2	1	0.543	0.328
5	1	3	0.429	0.340	7	2	2	0.612	0.315
5	1	4	0.484	0.323	7	2	3	0.684	0.303
5	2	0	0.327	0.383	7	2	4	0.760	0.293
5	2	1	0.380	0.360	7	2	5	0.841	0.284
5	2	2	0.435	0.340	7	2	6	0.926	0.277
5	2	3	0.492	0.323	7	3	0	0.552	0.329
5	2	4	0.550	0.309	7	3	1	0.623	0.315
5	3	0	0.385	0.360	7	3	2	0.696	0.304

## CONTINUACION

P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	NMP	error estandar	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	NMP	error estandar
5	3	1	0.441	0.340	7	3	3	0.775	0.294
5	3	2	0.499	0.324	7	3	4	0.858	0.286
5	3	3	0.559	0.310	7	3	5	0.947	0.278
5	3	4	0.622	0.298	7	3	6	1.042	0.272
5	4	0	0.447	0.341	7	4	0	0.634	0.316
5	4	1	0.507	0.324	7	4	1	0.710	0.305
5	4	2	0.568	0.310	7	4	2	0.790	0.295
5	4	3	0.632	0.298	7	4	3	0.877	0.287
5	4	4	0.699	0.288	7	4	4	0.969	0.280
6	0	0	0.280	0.414	7	4	5	1.068	0.273
6	0	1	0.332	0.384	7	4	6	1.176	0.268
6	0	2	0.386	0.360	7	5	0	0.724	0.306
6	0	3	0.442	0.341	7	5	1	0.808	0.296
6	0	4	0.500	0.324	7	5	2	0.896	0.288
6	1	0	0.336	0.384	7	5	3	0.992	0.281
6	1	1	0.391	0.361	7	5	4	1.096	0.275
6	1	2	0.449	0.341	7	5	5	1.209	0.270
6	1	3	0.508	0.325	7	5	6	1.332	0.266
7	6	0	0.825	0.298	8	4	3	1.054	0.287
7	6	1	0.917	0.290	8	4	4	1.171	0.282
7	6	2	1.018	0.283	8	4	5	1.301	0.278
7	6	3	1.126	0.278	8	4	6	1.444	0.274
7	6	4	1.244	0.273	8	4	7	1.607	0.272
7	6	5	1.376	0.269	8	5	0	0.870	0.302
7	6	6	1.523	0.266	8	5	1	0.972	0.295
8	1	0	0.495	0.346	8	5	2	1.085	0.289
8	1	1	0.564	0.330	8	5	3	1.208	0.284
8	1	2	0.637	0.317	8	5	4	1.346	0.281
8	1	3	0.714	0.306	8	5	5	1.500	0.278
8	1	4	0.796	0.296	8	5	6	1.679	0.277
8	2	0	0.574	0.331	8	5	7	1.886	0.277
8	2	1	0.648	0.318	8	6	0	0.999	0.297
8	2	2	0.728	0.307	8	6	1	1.117	0.292
8	2	3	0.812	0.297	8	6	2	1.248	0.288
8	2	4	0.903	0.289	8	6	3	1.396	0.285
8	2	5	1.001	0.283	8	6	4	1.565	0.283
8	2	6	1.106	0.277	8	6	5	1.760	0.283
8	3	0	0.662	0.319	8	6	6	1.993	0.285
8	3	1	0.744	0.308	8	6	7	2.279	0.288
8	3	2	0.831	0.299	8	7	0	1.153	0.295
8	3	3	0.925	0.291	8	7	1	1.293	0.291
8	3	4	1.027	0.285	8	7	2	1.452	0.289
8	3	5	1.138	0.279	8	7	3	1.636	0.289
8	3	6	1.259	0.275	8	7	4	1.855	0.291
8	3	7	1.395	0.271	8	7	5	2.124	0.294
8	4	0	0.759	0.310	8	7	6	2.465	0.301
8	4	1	0.850	0.301	8	7	7	2.921	0.312
8	4	2	0.947	0.293					

El número encontrado en la tabla se multiplica por el factor de dilución:

$1.565 \times 64 = 100.16$  que es el número más probable en 0.05 ml de suspensión; se multiplica este dato por 20 para obtener el número más probable en 1 ml del inóculo original.

$$20 \times 100.6 = 2,003.2$$

El NMP/ml de la suspensión original es 2,003.2

La técnica de microplaca da números probables más altos que los de la técnica de tubos convencionales pero presenta varias ventajas:

- facilidad con la que pueden procesarse grandes números de muestras.
- incremento de la precisión
- ahorro en equipo, reactivos y espacio para la incubación.

La técnica también se ha usado para poblaciones desnitrificantes y puede adaptarse para otras determinaciones, usando diferentes tipos de medio de cultivo.



### 21.3.10 Método de Kerbs, Hutton y Hollister.

Estos investigadores hicieron un micrométodo visual para medir los efectos de agentes antifúngicos sobre la germinación y sobre el crecimiento de los hongos. Este procedimiento se ha ensayado con *griseofulvina* como agente antifúngico y con *Trichophyton mentagrophytes* como microorganismo de prueba, obteniéndose mejores resultados que con la prueba estándar basada en la determinación del peso del micelio seco.

Los pasos del micrométodo son:

- 1.- Se preparan soluciones de agarosa SeaPlaque al 0.2% y 0.8%; se hierven y se enfrían; se mantienen a -45°C.
- 2.- Con una jeringa automática de 50µl se coloca en el centro de cada pozo de una placa de microtitulación de fondo plano, una gota de 1 µl de la solución de agarosa al 0.8%. Esta gotita aumenta la adherencia de las esporas suspendidas en agarosa. Se usan 5 pozos para cada dilución de prueba, pero no se trabaja con

Los pozos periféricos de la placa ya que en ellos la evaporación es diferente a la del resto de la placa, de modo que se dispone de 60 pozos en cada placa.

- 3.- Se coloca la placa de microtitulación con las gotitas de agarosa sobre una placa calentadora a 45°C y se pone la tapa de la placa tangencialmente para ayudar a la evaporación. Cuando las gotitas están casi secas (cerca de 30 minutos), se retira la microplaca de la placa calentadora y se deja a temperatura ambiente.
- 4.- Se añaden 10  $\mu$ l de una suspensión con  $2.4 \times 10^6$  esporas/ml a 70  $\mu$ l de la solución de agarosa al 0.2% y se colocan 2  $\mu$ l de esta suspensión de esporas en el centro de cada pozo previamente cubierto con la agarosa. Cada gotita de 2  $\mu$ l contiene 600 esporas.
- 5.- Se coloca la placa de microtitulación sobre una superficie nivelada, a 4°C durante 30 minutos para que solidifiquen las gotitas.

- 6.- Se hacen diluciones del agente antifúngico en el medio de cultivo y se ponen 0.1 ml de cada dilución - en un pozo.

Los pozos control reciben sólo 0.1 ml de medio de cultivo.

- 7.- Se incuba la placa de microtitulación a 30°C.

- 8.- Se observan los resultados en tiempos determinados para examinar:

8.1 -Germinación: examinar 100 esporas en cada uno de 3 pozos de la misma dilución y se - - cuenta el número de esporas - con y sin túbulos de germinación.

8.2 -Longitud de las hifas: usando una escala en el ocular, se - miden las hifas primarias que estén creciendo de 20 esporas.

8.3 -Crecimiento total de hifas: - Usando una rejilla ocular con 100 cuadros, se cuenta el número de cuadros ocupados con elementos hifales. Se cuen--tan 5 rejillas en diferentes pozos de la misma serie.

8.4 -Esporulación: se observan diariamente los cultivos para deteectar la formación de esporas.

Se pueden obtener los siguientes datos:

- Tiempo y concentración del agente que reducen la germinación de esporas.
- Mínima concentración del agente que afecta la longitud de las hifas en 24 horas.
- Mínima concentración del agente que inhibe el crecimiento visible.
- Alteraciones en las hifas y/o en las esporas y concentraciones a las que se presentan.

El micrométodo es más seguro y sensible que el método convencional ya que permite detectar un crecimiento tan pequeño que no es medible por el método convencional y permite detectar alteraciones morfológicas.

Además, económicamente hablando, la prueba del micrométodo cuesta 80% menos que las pruebas de macrométodos; el tiempo requerido para llevarlo a cabo es hasta un 80% menor, ya que los resultados pueden obtenerse en 18 a 48 horas, mientras que con el método convencional

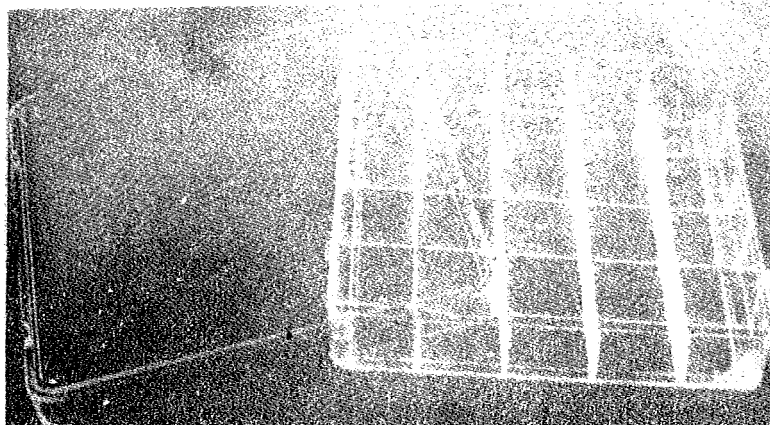
se requieren de 5 a 6 días.

### 21.3.11 Método de Goodfellow y Gray.-

Se ha visto que algunos métodos de inoculación múltiple sobre placas de agar individuales, presentan la desventaja de la difusión de los metabolitos a través del agar, así como el esparcimiento de algunas de las colonias sobre la superficie de agar; es por ésto que Harris diseñó un método para inocular una serie de discos de agar en una caja petri, ya que había observado la necesidad de separar los recipientes para el cultivo. Más tarde, Goodfellow y Gray hicieron unas cajas petri subdivididas en compartimientos separados, las cuales se producen ahora comercialmente; además describieron un método para distribuir el medio de cultivo rápidamente en las cajas petri divididas así como un inoculador múltiple automático para la transferencia simultánea de 25 cultivos dentro de estas cajas.

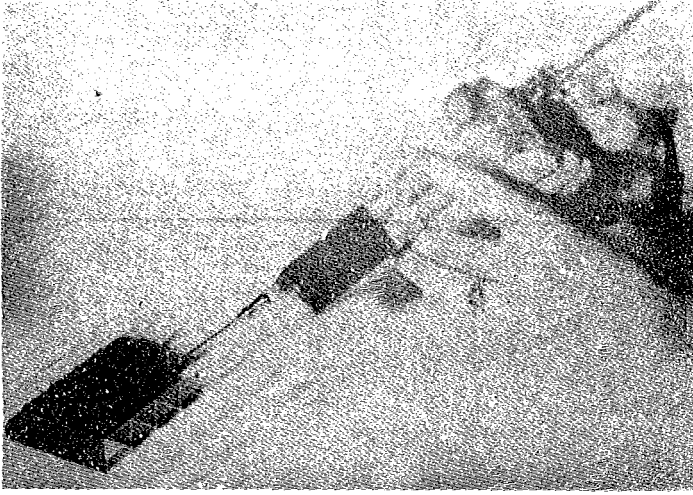
La caja petri subdividida es de plástico y tiene 25 compartimientos, cada uno con medidas internas de 19 x 19 x 18 (espesor) mm. Las dimensiones tota-

les son 106 x 106 x 21 mm cuando la tapa está en la posición más baja. La tapa puede levantarse 2.5 mm rotándola 90°.

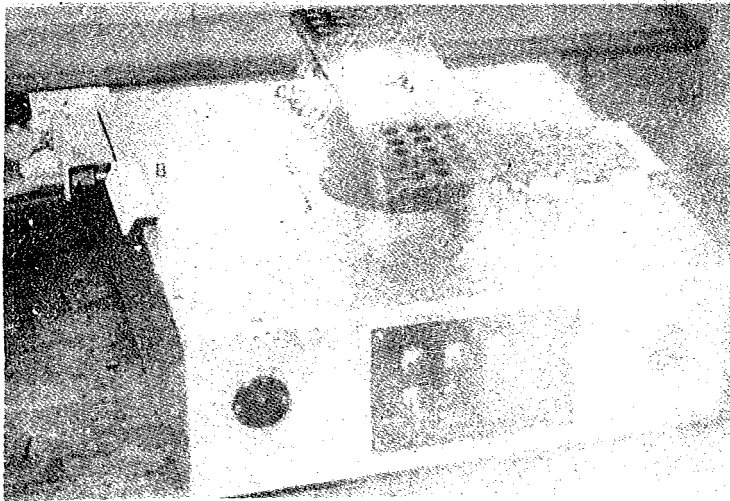


Caja petri subdividida de Goodfellow y Gray.

Para ubicar cada subdivisión de la caja se le hace a ésta una marca de referencia sobre una esquina de la base. Los compartimientos se llenan con 2 ml de medio (líquido, sólido ó semi-sólido) usando jeringas de 50 ml como se observa en la siguiente figura:



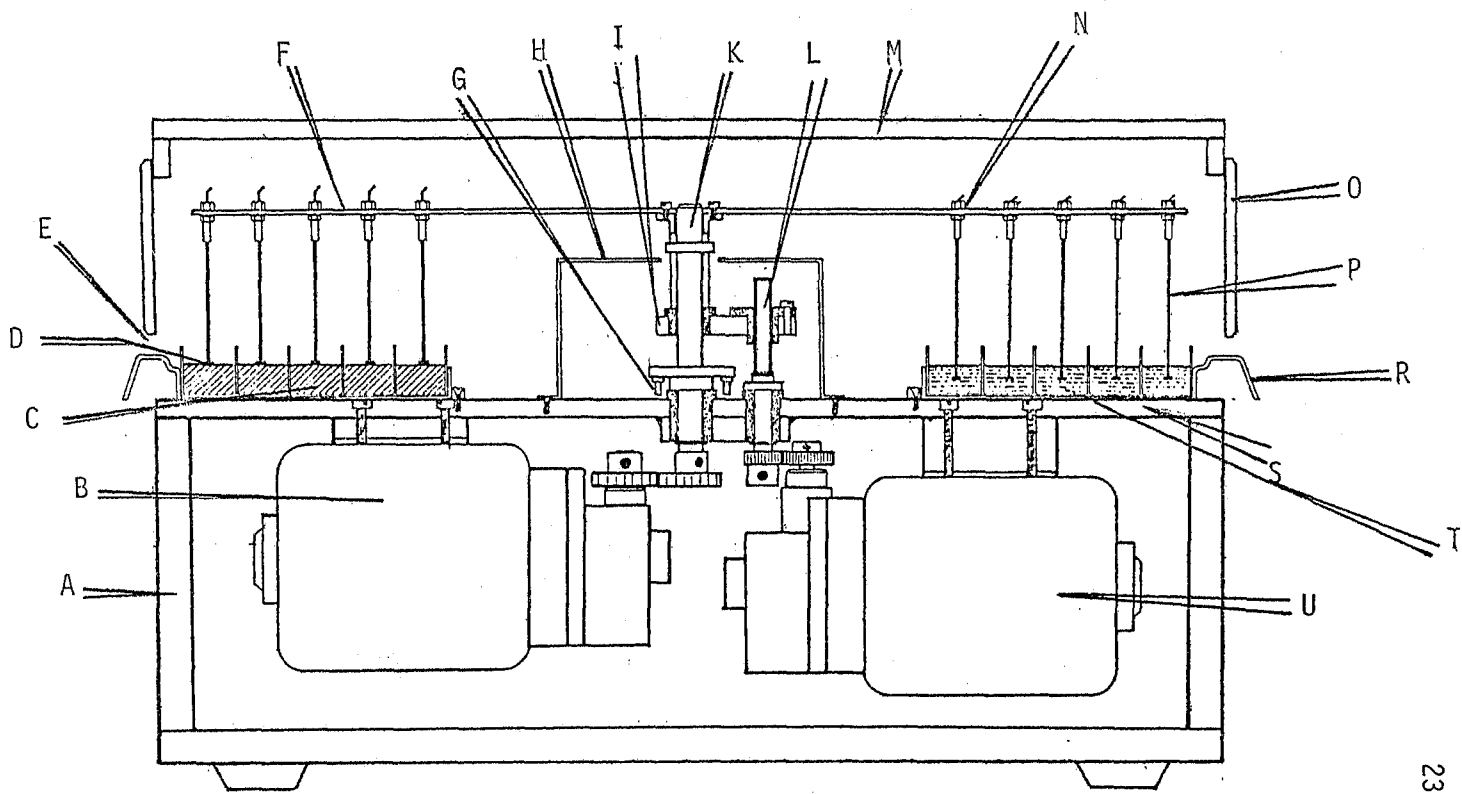
Este proceso es más rápido que el llenado con pipeta. Las placas con el agar se secan a  $45^{\circ}$  durante 45 minutos y se preincuban a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas - antes de la inoculación. El inoculador es el siguiente:



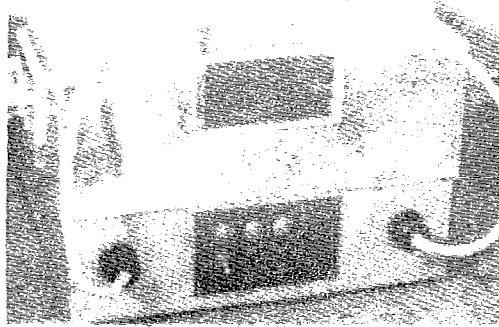
El inoculador consta, como se observa en el esquema siguiente, de una viga que -- porta dos series de 25 asas inoculantes de alambre. Esta viga es operada por dos móto res que le dan movimientos de rotación, as- censo y descenso. Las asas pueden deslizar se libremente. Montado en la base están -- una batería de mecheros de gas que reciben una mezcla de gas/aire y una lámpara piloto para encender los mecheros. (Diagrama pági- na 235, especificaciones a continuación).

A. Caja que contiene motores, circuitos - - eléctricos y controles gas/aire; B. motor - para que gire la viga (2 1/4 r.p.m.); C. - caja subdividida con medio sin inocular; D. asas inoculantes, descansando sobre la su-- perficie del agar; E. Apertura para permiti- tir la entrada de la bandeja; F. Viga en la posición baja; G. Clavillo para controlar el motor de la viga que la hace girar; H. Cobertura por encima del astil que impulsa y del mecanismo de ascenso de la viga; I. Placa para transporte; K. Astil que impulsa; L. Tornillo que se levanta; M. cober- tura; N. guías de las asas inoculantes; R. bandeja para acarrear la caja subdividida; S. placa basal; T. caja subdividida conte- niendo "cultivos madre" de bacterias; U. - motor de la viga para el ascenso y descenso de la misma.





Una de las cajas petri contiene una serie de "cultivos madre" de aislamientos bacterianos y la otra tiene agar ó medio en caldo sin inocular. El aparato completo se cubre con un caparazón de aluminio como se observa en la figura siguiente:



Este aparato tiene ventanas laterales de perspex y en el techo tiene una chimenea para la extracción del calor de los mecheros. Una hendidura en la viga por detrás de los mecheros permite la entrada de aire para compensar el perdido por la chimenea. La esterilidad de la cabina se mantiene con

dos lámparas U.V. colocadas bajo la cobertura; éstas se dejan toda la noche antes de usar el inoculador.

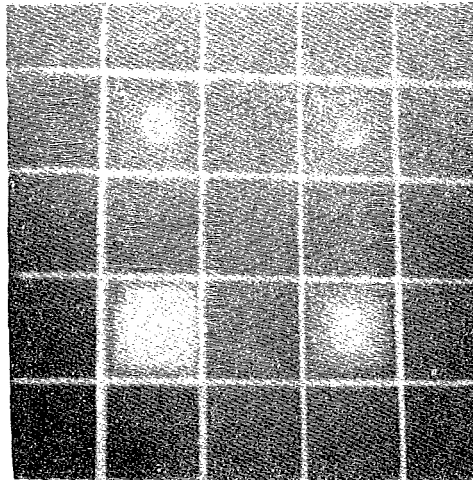
La operación del inoculador es muy simple y comprende sólo 2 etapas importantes en cuanto a la serie de 25 asas:

- 1) esterilización.- Con una serie de asas directamente sobre los mecheros, se oprime el botón de "encendido de mechero". Este acciona al piloto y a las válvulas de gas y aire, además de hacer funcionar el motor contador de tiempo; el piloto se mantiene encendido y después de 10 segundos que es el tiempo de esterilización de las asas, el motor de tiempo corta el suministro de gas/aire.
- 2) inoculación.- Después de dejar que se enfríen las asas durante 4 segundos, se oprime el botón de "girar" y la viga se mueve 90° en el sentido de las manecillas del reloj, llevando las asas cerca de los "cultivos madre". Entonces se hace funcionar el botón correspon-

diente y comienzan a bajar y subir las asas dentro de los "cultivos - madre". Cuando están en la posición más baja, un microswitch hace funcionar un circuito que hace que las asas cargadas con inóculo abandonen esa caja petri. En la posición más alta, se vuelve a activar el motor para girar la viga y entonces se voltea  $90^\circ$ ; en esta posición las asas pueden ser esterilizadas si es necesario, ó girar otros  $90^\circ$  si se oprime nuevamente el botón de "girar", de modo que las asas queden sobre la placa con medio sin inocular. La operación automática del motor de la viga que la sube y baja, deposita el inóculo sobre el medio. Si el medio es sólido las asas se quedan sobre la superficie y su filamento resbala libremente hacia dentro. Finalmente cuando la viga ha sido levantada otra vez, el motor gira la viga y regresa las asas a los mecheros. Después pueden incubarse las placas. Este procedimiento se repite para otras placas que --

contienen diferentes medios de prueba.

Con este método no se han observado -- contaminación aérea ni contaminación cruzada de bacterias como se observa en la siguiente figura en donde se inocularon cuatro de los compartimientos de la placa sobre agar-almidón, y no hubo contaminación cruzada en los compartimientos adyacentes.



Comparación con las técnicas de inoculación convencionales:

En el cuadro mostrado en la página si

guiente, se estima el tiempo utilizado por un operador en llevar a cabo cinco pruebas por medio de inoculaciones múltiples y convencionales sobre 215 cultivos.

Aunque la mayoría de los métodos son adaptables a una inoculación múltiple, algunos se efectúan mejor por los métodos convencionales, por ejemplo aquellos en donde se involucran la producción de gas ó compuestos volátiles.

OPERACION	INOCULACION MULTIPLE		INOCULACION CONVENCIONAL	
	TIEMPO (min)	%	TIEMPO (min)	%
1. Preparación de medio	145	15.1	150	2.8
2. Enjuague y secado de los tubos limpios.	-	-	165	3.1
3. Distribución del medio para la esterilización	36	3.8	173	3.2
4. Tapado de los tubos y frascos.	6	0.6	825	15.5
5. Esterilización del medio	20	2.1	140	2.6
6. Distribución de medio en las placas, y adición de componentes termo-lábil--les.	165	17.2	210	4.0
7. Secado de las placas de agar.	19	2.0	45	0.9
8. Rotulamiento de las placas y tubos.	130	13.5	195	3.7
9. Inoculación del medio -- con las bacterias, y -- transferencia del medio inoculado a la incubadora.	179	18.6	1 337	25.1
10. Preparación de la hoja de resultados.	20	2.1	20	0.4
11. Preparación de reactivos	30	3.1	35	0.7
12. Observación de cultivos y registro de resultados	140	14.6	550	10.3
13. Limpieza de tubos, frascos y otros objetos de vidrio.	40	4.2	1 440	27.1
14. Eliminación de las cajas petri de plástico	30	3.1	35	0.6
TIEMPO TOTAL UTILIZADO	960 min		5 320 min	

## CAPITULO III

P O S I B I L I D A D E S   D E   A P L I C A C I O N

La aplicación de los métodos miniaturizados, cada día más perfeccionados, no sólo sería de gran importancia para la economía de México al reducir el costo de los métodos -- por la utilización de cantidades muy pequeñas de los materiales, sino que sería un gran beneficio para el hombre actual porque el diagnóstico de algunas enfermedades puede obtenerse más rápidamente al efectuar la identificación de -- los microorganismos en poco tiempo.

De hecho, muchos de los métodos ya mencionados se están aplicando actualmente y con muy buenos resultados porque se han ido mejorando y adaptando según las condiciones de cada laboratorio. Pero hay algunos métodos que han sido abandonados porque presentaban algunas dificultades; me permito sugerir que se sigan investigando y modificando para contribuir así al desarrollo de la Microbiología.

Por ejemplo, una de las mayores dificultades en los métodos de cámaras de perfusión, ha sido que la irrigación, provoca un desplazamiento de las células, a menos que éstas se encuentren firmemente adheridas a un substrato; ya que las células bacterianas no se adhieren bien al vidrio por las fuerzas de tensión superficial causadas por la pared ce



lular. Esto no ocurre con las cámaras de perfusión utilizadas para estudios de células de tejidos, por lo que se explica la rápida evolución de este tipo de cámaras en ese campo, en tanto que el estudio de bacterias en cámaras de perfusión quedó estancado hace algunos años; y ahora se están haciendo pruebas para encontrar membranas de retención celular adaptables a este sistema, las cuales deben reunir las siguientes características.

- Deben ser permeables a los nutrientes requeridos por las células, así como a los productos del metabolismo.
- Su fuerza de tensión debe ser lo suficientemente grande para que pueda ser estirada completamente por algún mecanismo.

Hartman utilizó membranas Formvar (Polivinilo disuelto en etileno) para la retención celular pero presentaban las siguientes inconveniencias:

- Había deficiencias ópticas por la curvatura de la membrana.
- Había que demostrar que los solutos a ser perfundidos pasaran a través de la membrana para estar en contacto con las células.
- Uno se debía asegurar de que el etileno diclorado no se quedara en la membrana antes del contacto con el inóculo.

Otros investigadores utilizaron membranas de celofán como se ha indicado en el tema de cámaras de perfusión.

Otro de los problemas comunes en algunos métodos, son los de tipo óptico para obtener la máxima resolución posible, en las técnicas que involucran la observación microscópica.

Las cámaras deben presentar cierta simplicidad para la trayectoria óptica, manteniendo el menor número de diferentes índices de refracción, ya que por ejemplo, en las preparaciones con membrana húmeda simple entre cubreobjetos y portaobjetos, examinadas con objetivos secos, se ven involucrados 3 índices de refracción diferentes:

- aire: entre la preparación y el objetivo y entre la preparación y el condensador,
- vidrio: del porta y cubreobjetos
- agua: de la membrana interna.

Esto se puede solucionar usando el objetivo de inmersión, para eliminar la interferencia del índice de refracción del aire. También pueden ocurrir difracciones que dispersen la luz, ocasionadas por rayaduras en el vidrio, partículas de polvo ó bacterias muertas encontradas en el medio de agar; si alguna capa es coloreada entonces interviene además la absorción de ciertas longitudes de onda.

En los métodos de tubos capilares, uno de los principales problemas es el agotamiento rápido del oxígeno dentro del tubo; para poder usar esta técnica con microorga-

nismos aerobios, se tuvieron que usar tubos de plástico, los cuales son permeables al oxígeno.

La dificultad de la medición directa de las dimensiones celulares de muchas células en un experimento se ha vencido utilizando un sistema de filmación permanente para observar todos los cambios en las medidas celulares.

Muchos de los problemas mencionados previamente ya -- han sido resueltos. Además se ha observado un desarrollo enorme, en estos últimos años, de un gran número de métodos de inoculación múltiple mecanizados, los cuales han tenido mucha aceptación en los laboratorios, ya que realmente permiten procesar un gran número de muestras de una forma eficaz, segura, rápida y económica.

Por lo tanto, se ve que sí es posible la aplicación completa de los métodos miniaturizados, adaptándolos claro está, a las condiciones de cada laboratorio en particular.

## CAPITULO IV

C O N C L U S I O N E S

Debido a que no se le ha dado la importancia adecuada a la descripción de los métodos miniaturizados en la mayoría de los escritos Microbiológicos, me pareció importante desarrollar este tema, para que el Microbiólogo conozca los métodos que ya existen y no tenga que hacer redescubrimientos de estas técnicas; con ello, se le evitarán pérdidas de tiempo y se le facilitarán la selección y utilización de métodos miniaturizados, ya sea en su forma original ó adaptados a sus necesidades.

La literatura sobre este tipo de métodos no es abundante y está muy dispersa, incluso en los Estados Unidos de Norteamérica, en donde siempre existe una amplia producción de revistas y libros científicos.

Espero que esta recopilación de los métodos miniaturizados realmente sea de utilidad al lector, ya que las ventajas que ofrecen sobre los métodos convencionales son magníficas.

Considero recomendable la pronta incorporación de métodos miniaturizados a los laboratorios clínicos y de identificación de microorganismos, para que se trabajen en forma paralela a los métodos convencionales durante un tiempo tal, que permita la comparación y verificación de la confia

bilidad de los métodos miniaturizados y la realización de las adaptaciones necesarias. Esto llevaría a lograr su establecimiento como métodos básicos de rutina en vista de sus bajos costos y de la rapidez con que rinden resultados. Estos dos factores son de gran importancia tanto para la eficiencia del laboratorio clínico en cuanto al diagnóstico, como para la economía y máximo aprovechamiento de recursos materiales y humanos en todos los casos.

Así mismo, los métodos miniaturizados son de suma utilidad para impulsar la creación de centros de sistemas computacionales para la identificación de cultivos, en los cuales se tengan archivadas todas las clasificaciones microbianas. Un cultivo desconocido sería dividido en muchas porciones para someterlo a pruebas de propiedades fenotípicas mediante métodos miniaturizados y los resultados obtenidos serían comparados con los de los cultivos ya identificados; ésto sería de gran importancia para el progreso y desarrollo de la Microbiología y, por supuesto, para sus aplicaciones en beneficio del hombre.

## CAPITULO V

B I B L I O G R A F I A

- Bailey, R. and E. Scott. 1974. "Diagnostic Microbiology". The C.V. Mosby Company. U.S.A. pp. 402 y 403.
- Baillie, A. and R. Gilbert. 1970, 2a. reimpresión 1973. "Automation Mechanization and Data Handling in Microbiology". Academic Press. London, New York. pp. 175-194.
- Bergan, T. and J. Norris. 1979. "Methods in Microbiology". Vol. 13. Academic Press, Inc. London. pp. 84-87, 371, 402-409.
- Board, R. and D. Lovelock. 1973. "Sampling Microbiological Monitoring of Environments". Academic Press. London. pp. 210-223.
- Börje, Lindström. 1977. "Alternative Replica Plating Technique". Appl. Environ. Microbiol. 34(2): 224-227.
- Boyer, J. 1977. "Biochemical Characterization of anaerobic bacteria by an impregnated disk method". J. Clin. Microbiol. 5(6): 673-675.
- Burrows, W. 1974, "Tratado de Microbiología". -- Editorial Interamericana S. A. de C. V. México.

- D. F. pp. 20-24, 138, 139, 439, 481-486, 490,
- Cabtree, K. and R. Hindsill. 1974. "Fundamental Experiments in Microbiology". W. B. Saunders Company. Toronto, Canadá. pp. 119-121, 183.
  - "Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures". Difco Laboratories incorporated. Detroit, Michigan. U.S.A. p.p. 63.
  - Difco Supplementary Literature. Detroit, Michigan U.S.A. pp 23
  - Duxbury, T. 1977. "A Microperfusion Chamber for Studying the Growth of Bacterial Cells". J. Appl. Bacteriol. 43(2): 247-252.
  - Fung, D. and P.A. Hartman. 1975. "New Approaches to the identification of Microorganisms". John Wiley & Sons. U.S.A. pp. 347-369.
  - Gilliland, S. and L. Speck. 1977. "Use of the Minitex System for Characterizing Lactobacilli". Appl. Environ. Microbiol. 36(6): 1289-1292.
  - Guinée, M., M. Agterberg and W. Jansen. 1972. "Escherichia coli O Antigen Typing by Means of a Mechanized Microtechnique". Appl. Microbiol. 24(1): 127-131.
  - Ham, A. 1975. "Tratado de Histología". Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México D. F. pp. 9-20.

- Hartman, P.A. 1968, 3a. reimpresión 1970. "Miniaturized Microbiological Methods". Academic Press, London and New York. U.S.A. pp. 1-167.
- Kaneko, T., M. Holder-Franklin and M. Franklin. 1976. "Multiple Syringe Inoculator for Agar Plates". Appl. Environ. Microbiol. 33 (4): 982-985.
- Kerbs, S., R. Hutton and W. Hollister. 1978. "Visual micromethod for assay of fungal growth". Can. J. Microbiol. 24: 574-578.
- McComb, D. and C. Puzniak, 1974. "Micro Cell Culture Method for Isolation of Chlamydia trachomatis". Appl. Microbiol. 28(4): 727-729
- Morgan, J., P. Liu and J. Smith. 1976. "Semi-Micro-technique for the Biochemical Characterization of Anaerobic Bacteria". J. Clin. Microbiol. 4(4): 315-318.
- Morris, G., C. Steele and J. Wells. 1972. "Evaluation of Plastic Multi-Well Plates for Serological Screening of Salmonella Cultures with Spicer-Edwards Pooled Antisera". Appl. Microbiol. 24(5): 846-848.
- Norris, J. and D. Ribbons. 1969, 4a. reimpresión 1974. "Methods in Microbiology". Vol. I. Academic Press, London and New York. U.S.A. pp. 365-422.



- Rowe, R., Todd and J. Waide. 1976. "Microtechnique for Most-Probable-Number-Analysis". Appl. Environ. Microbiol. 33(3): 675-680
- Salle, A.J. 1967. "Fundamental Principles of Bacteriology". McGraw-Hill Book Company, pp. 334-336
- Sharpe, A., G. Pettipher and G. Lloyd. 1976. "A miniaturized counting technique for anaerobic bacteria". Can. J. Microbiol. 22: 1728-1733
- Sperber, W. and J. Swan. 1976. "Hot-Loop Test for the Determination of Carbon Dioxide Production from Glucose by Lactic Acid Bacteria". Appl. Environ. Microbiol. 31(6): 990-991
- Stargel, M., F. Thompson., S. Phillips., G. Lombard and V. Dowell, 1975. "Modification of the Minitek Miniaturized Differentiation System for Characterization of Anaerobic Bacteria". J. Clin. Microbiol. 3(3): 291-301.
- Stearman, W., J. Norman and H. del van Petersen. 1975. "Microapplicator and Micropipette for Inoculation of the Embryonated Chicken Egg".
- Stewart, D. and S. Widanapatirana. 1972. "A Simple Replicator for Utilization Studies". J. Appl. Bacteriol. 35(3): 517-518

- Warner-Lambert Company; Inter Office Memorandum, 1979. "MICRO-ID Identifies Bubonic Plague". Los Angeles. U.S.A. Basado en Los Angeles Times, Metro, part. II. Saturday, May 19, 1979 by Harry Nelson.
  
- Wilkins, T. and C. Walker, 1975. "Development of a Micromethod for Identification of Anaerobic Bacteria" Appl. Microbiol. 30(5): 825-830
  
- Wilkins, T., C. Walker and W. Moore, 1975. "Micromethod for Identification of Anaerobic Bacteria: Design and Operation of Apparatus". Appl. Microbiol. 30(5): 831-837.