

Capítulo 6

Control del crecimiento microbiano

6.1 Factores físico-químicos sobre el proceso de crecimiento de microorganismos

Objetivo

Reconocer la influencia de factores físicos sobre el proceso de crecimiento de bacterias y hongos.

Introducción

El calor y otros agentes físicos se suelen utilizar para esterilizar objetos, como lo demuestra el uso que tiene el autoclave en todos los laboratorios de microbiología. Los cuatro agentes físicos empleados con más frecuencia son calor, filtración, radiación ultravioleta y radiación ionizante (Prescott et al., 1999; Talaro, 2005).

Definiciones (OMS 2005)

- *Antiséptico*: sustancia que inhibe el crecimiento microbiano, pero no necesariamente las mata. Suele aplicarse a las superficies corporales (piel, mucosas). Ejemplos: mercuriales, nitrato de plata, solución de yodo, alcoholes
- *Bactericida*: cualquier agente físico o sustancia o mezcla de sustancias químicas capaz de matar algún tipo de bacterias

- *Bacteriostático*: agente que inhibe el crecimiento y reproducción de algunos tipos de bacterias.
- *Desinfectante*: sustancia o mezcla de sustancias químicas que mata microorganismos, pero no necesariamente esporas. Suelen aplicarse a superficies u objetos inanimados como superficies, utensilios etc. Ejemplos: cloro, hipoclorito, compuestos clorados, soda caustica, sulfato de cobre, compuestos de amonio cuaternario etc.
- *Esterilización*: proceso que mata o elimina todas las clases de microorganismos, esporas de bacterias y hongos y partículas virales.
- *Funguicida*: agente químico o físico con capacidad para matar hongos
- *Fungistático*: agente químico o físico que puede impedir o detenerle crecimiento de algunos hongos

Factores que tienen que ser considerados a la hora de aplicar agentes químicos o físicos para el control de microorganismos

- *Concentración del agente químico*: mientras más concentrado esté el agente químico, más rápido se destruirán los microorganismos.
- *Intensidad del agente físico*: cuanto más intenso es el agente físico (calor o radiación), más rápidamente mata a los microorganismos.
- *Tiempo de exposición*: a mayor tiempo de exposición, mayor es el número de microorganismos destruidos.
- *Temperatura*: a mayor temperatura, se acelera la destrucción de los microorganismos.
- *Número de microorganismos*: mientras mayor sea el número de microorganismos, más tiempo se requiere para destruirlos.
- *Clase de microorganismo*: las células bacterianas vegetativas (las que están metabólicamente activas) son más susceptibles que las esporas.
- *Estado fisiológico de las células*: mientras más viejos sean los microorganismos, más rápido se destruyen.
- *Naturaleza del medio ambiente*: algunos ambientes desfavorecen la destrucción rápida de los microorganismos, como por ejemplo los medios viscosos.

Métodos físicos

a. Calor

1. *Esterilización por calor húmedo:*

}	Ebullición
}	Autoclave
2. *Esterilización por calor seco:*

}	Flameado
}	Incineración
}	Horno
3. *Pasteurización*

b. Filtración

- c. Bajas temperaturas:

}	Refrigeración
}	Congelación
}	Liofilización

d. Dsecación

e. Presión osmótica

f. Radiaciones electromagnéticas:

- *Ionizantes:* rayos gamma, rayos X, haces de electrones de alta energía o rayos beta o catódicos
- *No ionizantes:* luz ultravioleta, microondas.

Calor

Como el calor es tan eficaz para destruir los microorganismos, es esencial disponer de una medida precisa de su eficacia termodestructiva.

- Inicialmente, esta eficacia se expresaba con el **punto de muerte térmica (PMT)**, la temperatura más baja a la que una suspensión microbiana se destruye en 10 minutos. Como el PMT implica que una determinada temperatura es inmediatamente letal a pesar de las condiciones ambientales.
- **(TMT) tiempo de muerte térmica.** Es el tiempo más corto necesario para destruir todos los organismos de una suspensión microbiana, a una temperatura específica y en condiciones definidas. Sin embargo, esta destrucción es logarítmica y, en teoría, no es posible “destruir completamente” los microorganismos de una muestra, incluso aumentando el tiempo de calentamiento.

- **Tiempo de reducción decimal (*D*) o valor *D*:** es el tiempo necesario para destruir el 90% de los microorganismos o esporas en una muestra a una temperatura específica. El valor *D* se escribe normalmente con un subíndice, que indica la temperatura que se aplica.
- El **valor *z*:** es el aumento de temperatura necesario para reducir *D* a 1/10 de su valor, o en un ciclo logarítmico cuando se representa $\log D$ frente a la temperatura.
- Otro método para describir la eficacia del calentamiento es el **valor *F*:** es el tiempo, en minutos y a una temperatura determinada (normalmente, 121.1 °C), necesario para

Métodos químicos

Son compuestos que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos. Incluyen sustancias usadas como conservantes, antisépticos y antibióticos que se utilizan para el tratamientos de enfermedades infecciosas en humanos, animales y plantas.

Los conservantes son usados en alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos para inhibir el crecimiento de microorganismos. Ejemplos: propionato de calcio, benzoato de sodio, formaldehído, nitrato, dióxido de azufre,

- a. Fenol y compuestos fenólicos (fenol al 5%, hexilresorcinol, hexaclorofenol)
- b. Alcoholes (etanol al 50-70%, isopropanol al 50-70%)
- c. Halógenos Tintura de yodo (2% I_2 en 70% alcohol), cloro, hipoclorito de sodio
- d. Metales pesados y sus compuestos (nitrato de plata, sulfato de cobre, cloruro de mercurio, merthiolate)
- e. Colorantes (cristal violeta, verde de malaquita)
- f. Detergentes aniónicos, catiónicos, anfóteros, enzimáticos
- g. Compuestos de amonio cuaternario (sales de amonio cuaternario)
- h. Ácidos y álcalis (**ácido sulfúrico, ácido nítrico, hidróxido sódico, hidróxido potásico**)
- i. Aldehídos, Glutaraldehído (formaldehído al 8%)
- j. Químicoestabilizadores gaseosos (óxido de etileno, beta propiolactona, formol)

Materiales

Asa bacteriológica redonda y recta

Suspensiones bacterianas de un bacilo Gram negativas de la Familia Enterobacteriaceae y bacilo Gram positivo

Suspensiones de mohos y levaduras

Cepas controles (*E. Coli* y *S. aureus*) en caldo nutritivo con una concentración de 10^8 - 10^9 células/ml

Caldo nutritivo (CN)

Caldo Sabouraud (CS)

Baño serológico

Horno de aire caliente a 175 °C

Autoclave

Procedimientos

Métodos físicos

Calor:

Esterilización por calor húmedo: ebullición

1. Servir una asada de la suspensión bacteriana o fúngica en caldo nutritivo/ caldo Sabouraud respectivamente y someterla al siguiente procedimiento:

Suspensión microorganismo inicial	Tiempo			
	5 min	Más 10 min (tiempo total: 15 min)	Más 15 min (tiempo total: 30 min)	
CN con bacilo Gram negativa	X (*)	X (*)	X (*)	Dos asadas
CN con bacilo Gram positivo	X (*)	X (*)	X (*)	Dos asadas
CS con un hongo filamentosos	X (*)	X (*)	X (*)	Dos asadas
CS con una levadura	X (*)	X (*)	X (*)	Dos asadas
Total de tubos por microorganismo para incubar	3 tubos			

2. Incubar los tubos de CN repicados a 37 °C/24-48 horas y CS 28 °C por 5 días respectivamente.

Esterilización por calor húmedo: esterilización (121 °C, 15 libras de presión, 15 minutos)

1. Coloque la suspensión bacteriana del bacilo Gram positivo y de un hongo filamentosos por 15 minutos en el autoclave. Luego tome dos asadas de la suspensión bacteriana o fúngica en un CN o CS estéril respectivamente.
2. Incubar los tubos de CN repicados a 37 °C/24-48 hora y CS 28 °C por 5 días respectivamente.

Esterilización por calor seco: flameado

1. Tome una asada de la suspensión bacteriana o fúngica y esterilice el asa en el mechero (parte baja de la llama) y luego introduzca el asa en un CN o CS estéril respectivamente.

2. Incubar los tubos de CN repicados a 37 °C/24-48 hora y CS 28 °C por 5 días respectivamente.

Esterilización por calor seco: horno (estufa de aire caliente (1 hora/170-180 °C)

1. Tome una asada de la suspensión bacteriana o fúngica y deposítela en un CN o CS estéril respectivamente.
2. Lleve la suspensión bacteriana o fúngica a la estufa por una hora/175 °C.
3. Una vez transcurrido este tiempo, tomar una asada de esta suspensión y colocarla en otro CN o CS estéril respectivamente.
4. Incubar los tubos de CN repicados a 37 °C/24-48 horas y CS 28 °C por 5 días respectivamente.

Radiaciones electromagnéticas: luz ultravioleta

1. Tome 4 cajas de AN y márkelas de la siguiente forma: control, caja número 1, 2, 3. A continuación divídalas en dos partes.
2. Tome 4 cajas de AS y márkelas de la siguiente forma: control, caja número 1, 2, 3. A continuación divídalas en dos partes.
3. Marque cada una de las partes de la caja de AN control con *E. Coli* y *S. aureus*.
4. Marque cada una de las partes de la caja AS control con el género del hongo filamentoso y levadura.
5. Introduzca un escobillón estéril dentro de cada emulsión bacteriana / emulsión de hongo filamentoso y levadura y rótelos contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo, todo bajo condiciones asépticas.
6. Siembre en cada una de las partes con el microorganismo correspondiente.
7. Someta las cajas a la luz ultravioleta de la siguiente manera:

Placa de Petri	Tiempo	Lectura (*)
Control	0 seg	
5	5 min	
6	30 min	
7	40 min	

Nota: en la cabina de flujo laminar, remueva la cubierta de la caja, colóquela al lado y cúbrala con la lámpara de luz ultravioleta.

6. Incube las placas a 37 °C por 24 a 48 horas.

Lectura:

1. Realice las lecturas de las cajas y los tubos y estime el crecimiento teniendo en cuenta:

-: sin crecimiento

+: crecimiento escaso

++: crecimiento moderado

+++: crecimiento abundante

y complete el siguientes cuadro:

2. complete los cuadros que están a continuación

Microorganismo inoculado	Ebullición			Autoclave	Flameado	Horno
	5 min	15 min	30 min			

Agente físico	Mecanismo de Acción	Usos
<i>Ebullición</i>		
<i>Pasteurización</i>		
<i>Autoclave</i>	Desnaturalizando proteínas y afectando todos los componentes celulares	
<i>Flameado</i>		
<i>Incineración</i>		
<i>Horno</i>	Oxidación de las proteínas	Material de vidrio, instrumentos de metal o aceites y polvos que soporten esas altas temperaturas
<i>Refrigeración</i>		

Agente físico	Mecanismo de Acción	Usos
<i>Congelación</i>		
<i>Liofilización</i>		
<i>Presión osmótica</i>	Deshidrata e inhibe el crecimiento bacteriano o fúngico	
<i>Rayos gamma</i>	Ioniza el agua y otras moléculas para formar radicales que pueden romper las hebras de ADN.	Guantes, suturas, catéteres, jeringas e incluso placas de Petri. También está aceptado su uso para disminuir la carga microbiana en alimentos.
<i>Rayos X</i>	Ioniza el agua y otras moléculas para formar radicales que pueden romper las hebras de ADN	Guantes, suturas, catéteres, jeringas e incluso placas de Petri. También está aceptado su uso para disminuir la carga microbiana en alimentos
<i>Haces de electrones de alta energía o rayos beta o catódicos</i>		
<i>Luz ultravioleta</i> Incluye longitudes de onda entre 100-400 nm	Su actividad microbicida depende de la longitud de onda, tiempo de exposición, material que debe atravesar. Siendo las longitudes de 260-270 nm .	
<i>Microondas</i>		
<i>Filtración</i>	Retiene a los microorganismos en la superficie	Esterilizar soluciones, especialmente en aquellos casos en que no se pueda realizar esterilización por calor.

6.2 Desinfectantes, antisépticos y antibióticos

Objetivo

Reconocer la influencia de los factores químicos sobre el proceso de crecimiento de bacterias.

Introducción

Los antimicrobianos son sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, naturales o sintéticas, con capacidad para matar o inhibir a los microorganismos. Dentro de estos se encuentran los desinfectantes, los antisépticos y los antibióticos.

Los antibióticos son productos del metabolismo secundario microbiano, que presentan acción letal sobre otros microorganismos. Incluyen agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antifúngicos y agentes antiparasitarios (antiprotozoos y antihelminthos). Su función consiste en dar ventaja al microorganismo productor para que pueda colonizar ambientes con más eficacia que sus competidores. Algunos géneros bacterianos capaces de producir antibióticos son *Sterptomyces* y *Bacillus* y hongos como *Penicillium*.

Materiales

Asa bacteriológica redonda y recta

Suspensiones en BHI de 12-24 horas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* con una concentración de 10^8 - 10^9 células/ml

Escobillones estériles

Agar nutritivo (AN)

Caldo nutritivo (CN)

Agar Mueller Hinton

Discos de papel filtro estériles impregnados con hipoclorito de sodio (5 %), jabón líquido para manos, jabón que se utiliza para la limpieza de los materiales de laboratorio, isodine y un desinfectante para el piso

0.5 ml de hipoclorito de sodio (5 %), jabón líquido para manos, jabón que se utiliza para la limpieza de los materiales de laboratorio, isodine y un desinfectante para el piso

Discos impregnados con antibióticos

Pinzas

Pipetas de 1 ml

Procedimiento

Desinfectantes, antisépticos

Siembra del microorganismo sobre placas de AN con el químico incorporado

1. Verter en el fondo de una caja de Petri vacía y estéril 0.5 ml de hipoclorito al 5 %, jabón líquido para manos, jabón que se utiliza para la limpieza de los materiales de laboratorio, isodine y un desinfectante para el piso. Una caja por sustancia.
2. Adicionar 15 ml del AN fundido (45-50 °C) a cada caja y homogenizar suavemente.
3. Dividir la placa en 4 sectores y sembrar en estría los dos microorganismos.
4. Marcar las cajas e incubar en posición invertida a 37 °C por 24-48 horas.

Técnica de discos impregnados con desinfectantes, antisépticos sobre placa con siembra masiva del microorganismo

1. Introducir un escobillón estéril dentro de la emulsión bacteriana o fúngica y rotarlo contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo, todo bajo condiciones asépticas.
2. Sembrar masivamente con el escobillón sobre la superficie del medio.
3. Tomar con pinzas estériles los discos de papel filtro impregnados con las diferentes sustancias y escurrirlos.
4. Colocar cada uno de los discos dejando una distancia uniforme entre ellos (aprox. 2 cm) (Figura 32).

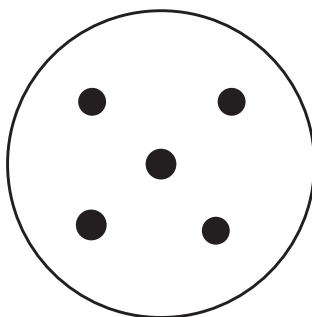


Figura 32. Distribución de los discos.

Fuente: Aura Lizarazo Forero

5. Presionar los discos ligeramente sobre el medio para asegurar el contacto, marcar las cajas e incubar en posición invertida a 37 °C por 24-48 horas.
6. Observar crecimiento y diámetro de las zonas de inhibición.

Antibióticos (antibiograma)

1. Sembrar masivamente con el escobillón impregnado previamente con el microorganismo sobre la superficie del medio agar Mueller Hinton.
2. Colocar los discos dejando una distancia uniforme entre ellos (aprox. 2 cm) con las pinzas estériles (Figura 31).
3. Presionar los discos ligeramente sobre el medio para asegurar el contacto, marcar las cajas e incubar a 37 °C por 48 horas.
4. Observar crecimiento y diámetro de las zonas de inhibición

Lectura:

Realice las lecturas de las cajas y complete los siguientes cuadros:

Microorganismo Inoculado	Desinfectantes y antisépticos				
	Hipoclorito de sodio (5 %) (HS)	Jabón líquido de manos (J)	Jabón limpieza materiales de laboratorio (JL)	Isodine (I)	Desinfectante (D)

Microorganismo Inoculado	Antibióticos				
	Antibiótico 1	Antibiótico 2	Antibiótico 3	Antibiótico 4	Antibiótico 5

Agente químico	Mecanismo de Acción	Usos
Fenol al 5%		
Hexilresorcinol, hexaclorofenol	Desnaturalizan proteínas y rompen las membranas celulares	Antisépticos a bajas concentraciones, desinfectantes a altas concentraciones
Etol (50-70%)	Desnaturaliza proteínas y solubiliza lípidos	Antiséptico usado en piel
Isopropanol (50-70%)	Desnaturaliza proteínas y solubiliza lípidos	Antiséptico usado en piel
Tintura de yodo		
Cloro (Cl_2) gas	Forma ácido hipocloroso (HClO), un fuerte agente oxidante	Desinfección en general y en particular para agua potable
Hipoclorito de sodio		

Agente químico	Mecanismo de Acción	Usos
Metales pesados y sus compuestos		
Metales pesados y sus compuestos :timerosal (merthiolate)		
Cristal violeta		
Sales de amonio cuaternario		
Detergentes		
Ácidos y álcalis		
Aldehídos: Formaldehído (8%)	Reacciona con grupos-NH ₂ , -SH y -COOH	Desinfectante, mata endosporas
Óxido de etileno	Agente alquilante	Desinfectante usado para esterilizar objetos sensibles al calor como goma y plásticos

