

Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales

Julio Ricardo Moreno. Virginia Helena Albarracín

Facultad de Ciencias Naturales e IML. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205-4000.
San Miguel de Tucumán. Argentina.

Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de Lagunas Andinas LIMLA. Planta Piloto de Procesos
Industriales Microbiológicos PROIMI-CONICET. Av. Belgrano y Pje. Caseros 4000.

San Miguel de Tucumán. Argentina.

julio_m@live.com.ar

virginia@proimi.org.ar

Resumen: se emplearán muestras naturales (agua, suelo, sedimentos de ríos o lagos, heces, etc.) a partir de las cuales se aislarán microorganismos cultivables, principalmente bacterias, mediante el empleo de medios selectivos. Posteriormente se procederá a la identificación por características morfológicas y patrones fisiológicos particulares.

Palabras clave: Microorganismos ambientales. Bacterias. Hongos. Algas. Aislamiento. Cultivo. Resiembra. Cepario. Caracterización morfológica. Tinciones. Colorantes. Identificación bioquímica.

OBJETIVOS

- Obtención de cultivos puros de microorganismos ambientales mediante aislamiento selectivo y sus sucesivas resiembras por estriado en medio agarizado.
- Confección de un cepario bacteriano para mantener un stock de los microorganismos aislados en un agente conservante (glicerina anhidra 20% v/v a -80°C) para su posterior utilización.
- Observación y caracterización preliminar a partir de preparaciones microscópicas en fresco y tinciones simples que permitan la diferenciación de la morfología y tamaño celular, así como algunas estructuras particulares (envoltura capsular, endosporas, exosporas y corpúsculos metacromáticos).
- Caracterización específica mediante tinciones negativas (tinción capsular), diferenciales (tinción de Gram y de Ziehl-Neelsen) y selectivas (tinción de esporas).

- Identificación bioquímica mediante técnicas simples que permitan la identificación de actividades enzimáticas presentes en los microorganismos, las cuales, por otro lado, contribuyen a la identificación taxonómica de los mismos.

MATERIAL DE TRABAJO

Agitador vortex. Agua destilada. Asa de siembra. Barbijos. Colorantes (Safranina, Violeta cristal, Fucsina fénica, Azul de metileno y nigrosina). Cubreobjetos. Delantal. Espátula de Drigalsky. Guantes. Etanol. Gafas. Gradillas para microtubos. Gradillas para tubos plásticos. Tubos plásticos estériles. Mecheros. Microscopio óptico. Microtubos estériles de 1,5 ml. Placas de Petri con medio agarizado con antibióticos. Peróxido de hidrógeno. Pipetas automáticas. Portaobjetos. Soluciones decolorantes (Alcohol-acetona y solución alcohólica acidificada). Solución fisiológica de sembrado (agua destilada 9% NaCl). Tips estériles. Varilla de vidrio. Vasos de precipitación.

MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas identificadas de microorganismos (controles positivos). Cultivos puros en medio líquido y medio agarizado. Resiembras de microorganismos aislados. Suspensión de una mezcla de microorganismos ambientales (agua, sedimentos, heces, etc.).

ACTIVIDADES

Aislamiento

El trabajo con microorganismos no se realiza con células aisladas, sino con poblaciones extensas y homogéneas del microorganismo a estudiar. Por lo tanto, el microbiólogo utiliza técnicas que permiten obtener un cultivo puro, y luego cultivar a mayor escala dicho microorganismo.

Para obtener cultivos puros se han de utilizar instrumentos estériles, es decir, libres de otros microorganismos no deseados (contaminantes). La esterilidad se consigue por diferentes métodos previamente estudiados: calor seco, calor húmedo, filtración, esterilización química, radiación. Para poder estudiar los microorganismos en el laboratorio, el microbiólogo también debe utilizar medios de cultivo que posean los nutrientes necesarios para el crecimiento de los mismos. Si los nutrientes están en forma de solución acuosa hablamos de medios de cultivo líquidos, mientras que si a esta solución se añaden solidificantes, como la gelatina o el agar (2-3%), obtenemos medios de cultivo sólidos. A veces se utilizan medios de cultivo semisólidos, si la concentración de agar es 0,6-1,5%. Los medios de cultivo se esterilizan generalmente mediante calor húmedo (Autoclave). En este trabajo utilizaremos los medios ISP2, TSB y 5339 específicos

para Actinobacterias, cuya formulación se explica detalladamente en el trabajo de Albarracín, V.H. (2007), que estará a disposición durante el trabajo práctico.

Para aislar un microorganismo de una mezcla de varios y obtener un cultivo puro del mismo, la técnica más utilizada es la de siembra por estría en medio sólido, en medio sólido, que permite obtener colonias separadas de individuos que proceden por división de una única célula. Estas colonias nos sirven para iniciar un cultivo a gran escala. Otra técnica consiste en obtener una suspensión de la mezcla de microorganismos y hacer diluciones seriadas que se vierten en una placa Petri hasta conseguir colonias aisladas. Una vez que se ha obtenido un cultivo puro, se puede mantener haciendo resiembras sucesivas o conservando las células en refrigeración empleando un agente conservante, más comúnmente glicerol (10-30%) a -80°C , en nitrógeno líquido a -173°C , o mediante liofilización.

Procedimiento

- Seleccionar la muestra a partir de la cual se realizaran los aislamientos (suelo, heces, sedimentos, agua, etc.), pesar un gramo de la misma y colocarla en un tubo Falcón estéril al cual se le adicionarán 9 ml de solución fisiológica de sembrado (agua destilada 0.9% NaCl), colocar la tapa y agitar hasta homogeneizar el contenido con un agitador vórtex.
- Una vez obtenida una muestra homogeneizada, realizar diluciones seriadas según indica el esquema (Fig. 1). Con una micropipeta se toman 1000 μl de la muestra total, y se colocan en un tubo falcón estéril con 9 ml de solución fisiológica de sembrado y homogeneizar con un agitador vortex, obteniendo una dilución de 10^{-2} ; repetir dos veces para llegar a una dilución de 10^{-4} .

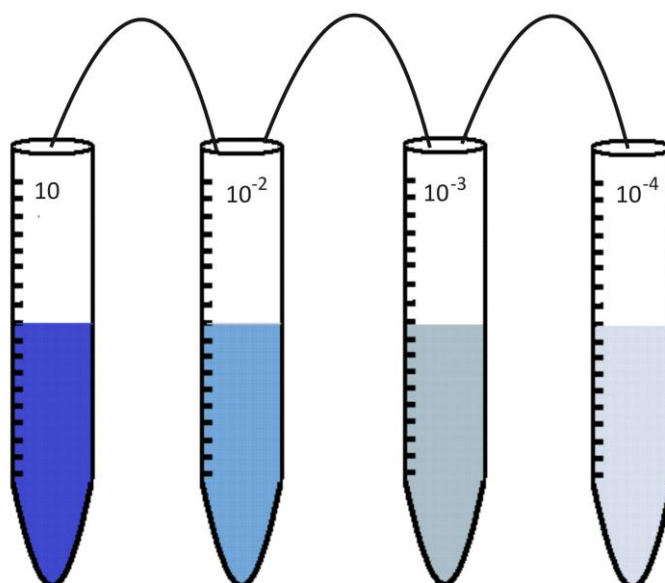


Figura 1. Representación del sistema de diluciones seriadas.

- El siguiente esquema (Fig. 2) explica el proceso de inoculación en placa con medio sólido. Los medios seleccionados fueron ISP2, TSB y 5339 con adición de antibióticos (Cicloheximida para inhibir el crecimiento de hongos y Ácido Nalidíxico para inhibir bacterias Gram negativas). Con una pipeta micropipeta extraer 100 μ l del inóculo (Fig. 2 A) y volcarlo en una placa con el medio seleccionado (Fig. 2 B). Con la ayuda de una espátula de Drigalsky previamente esterilizada, esparcir el inóculo de manera homogénea en todas direcciones hasta que la superficie del agar quede completamente seca (Fig. 2 C). Por último incubar las placas en posición invertida durante 24 horas en una estufa a 28°C (Fig. 2 D). La posición invertida evitará que agua de condensación se deposite sobre el medio de cultivo, dificultando la obtención de colonias aisladas.

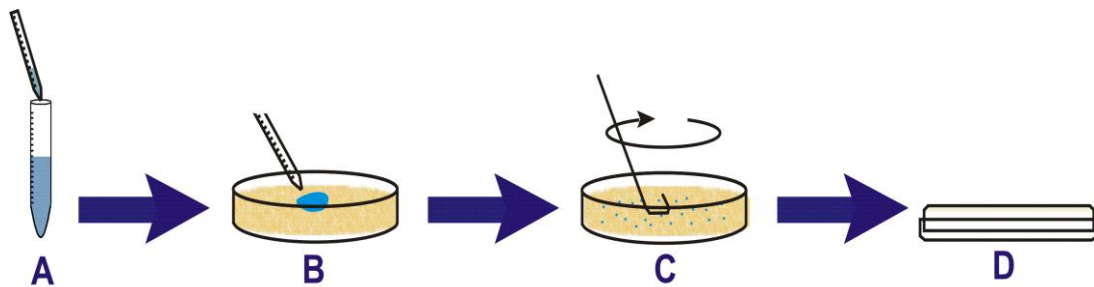


Figura 2. Proceso de inoculación de la muestra en placa con medio de cultivo agarizado.

- Una vez transcurridas las 24 horas (en algunos casos hasta más tiempo), se observarán colonias separadas en las placas (Fig. 3 A), las cuales deben ser resiembradas en una nueva placa de Petri. La resiembra se realiza transfiriendo las colonias de interés con ayuda del asa de siembra, y en la nueva placa distribuir las células con la técnica de estriado en agar (Fig. 3 B). Por último incubar las placas en posición invertida durante 24 horas en una estufa a 28°C (Fig. 3 C).

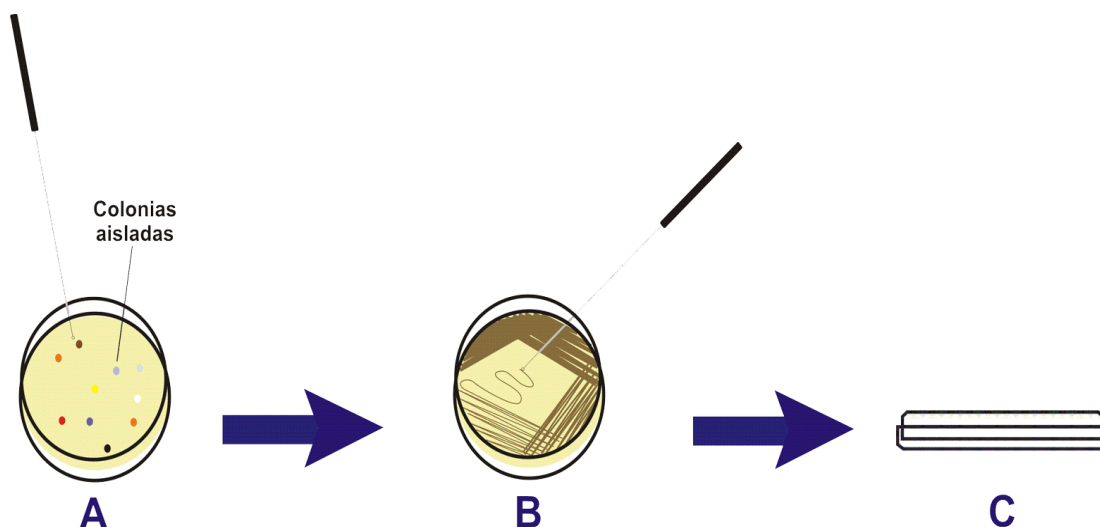


Figura 3. Resiembra de las colonias aisladas.

- El paso final del aislamiento consiste en lograr un stock permanente del microorganismo aislado, lo cual se consigue mediante la confección de un cepario. Una alternativa comúnmente utilizada es mantener las células a temperaturas de entre -20°C y -80°C en un agente conservante como el glicerol al 20%, para lo cual debe cultivar el microorganismos en medio líquido hasta su fase exponencial de crecimiento, luego por centrifugación obtenemos un pellet de células y eliminamos el sobrenadante constituido por el medio de cultivo, para luego resuspender las células en glicerol y posteriormente refrigerarlas. También se puede optar por deshidratar las células mediante liofilización. Algunos microorganismos como algas y hongos son vulnerables a estas técnicas por lo cual se requieren resiembras periódicas para mantener la disponibilidad de los microorganismos.

Observación microscópica

Para observar una muestra al microscopio óptico podemos realizar preparados frescos simplemente colocando una gota de la suspensión de microorganismos entre un porta y un cubreobjetos y observar directamente. También podemos fijar la muestra antes de observar para lo cual se coloca una suspensión homogénea de microorganismos sobre el portaobjetos y se fija (mediante calor o agentes químicos). En ambos casos suele ser necesario utilizar coloraciones de contraste para diferenciar las células, para lo cual se usan diferentes técnicas. Estas preparaciones se observan habitualmente con objetivos de inmersión.

Tinciones

Son técnicas que permiten observar microorganismos en función de la capacidad de los mismos para retener o no determinadas sustancias colorantes, lo que depende de la carga de la célula y del colorante. Los colorantes pueden ser de distintos tipos, como por ejemplo los colorantes catiónicos. Éstos son sustancias que tienen carga positiva. Penetran en el interior de las células y las tiñen. Ejemplos: azul de metileno, cristal violeta, safranina. Otros tipos de colorantes son los aniónicos, los cuales poseen carga negativa. No penetran en el interior celular, de modo que no tiñen las células, sino el entorno. En este caso se habla de tinción negativa. Ejemplos: eosina, nigrosina. Existen colorantes con afinidad por ciertas sustancias, en nuestro caso utilizaremos colorantes liposolubles. Se caracterizan por su capacidad de integrarse con los lípidos celulares coloreándolos. Ejemplo: negro Sudán.

A su vez, las tinciones pueden ser: Simples, diferenciales o selectivas. Las tinciones simples utilizan un solo colorante. Se basan en el hecho de que las células tienen una composición química diferente a la de su entorno, de modo que ambos se comportan de forma diferente frente a un colorante. Las tinciones diferenciales se basan en el hecho de que distintos tipos de células tienen distinta composición química, y por lo tanto reaccionan de forma diferente frente a una tinción, lo que permite clasificar los microorganismos en diferentes grupos, según su capacidad de tinción. En este apartado

están dos tinciones de importancia taxonómica y clínica (Tinción de Gram y Ziehl-Neelsen).

La tinción de Gram (Fig. 4) permite diferenciar dos grandes grupos de bacterias: Gram positivas y Gram negativas. La técnica se basa en propiedades estructurales de la pared celular de ambos tipos de microorganismos, no siendo una reacción específica. Las bacterias Gram positivas poseen como componente estructural un 90% de peptidoglucano, mientras que las bacterias Gram negativas solo poseen un 10% de estos compuestos. Por lo tanto, si bien ambas pueden ser teñidas por el colorante cristal violeta (Fig. 4 A), la diferencia entre ambas radica en su resistencia a la decoloración (Fig. 4 B). Las bacterias Gram positivas gracias a su gruesa pared impiden la entrada del decolorante y por lo tanto la salida del complejo yodo-colorante. Por el contrario en las bacterias Gram negativas, los lípidos de la pared (más abundantes que en las células Gram positivas) se disuelven por este tratamiento, lo que permite el escape del complejo del yodo-colorante. Después de la decoloración las células Gram positivas son todavía púrpuras, pero las Gram negativas son incoloras. Para poner de manifiesto las células Gram negativas se utiliza una coloración de contraste. Habitualmente es un colorante de color rojo, como la safranina o la fucsina básica. Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rosadas, mientras que las Gram positivas permanecen púrpuras (Fig. 4 C).

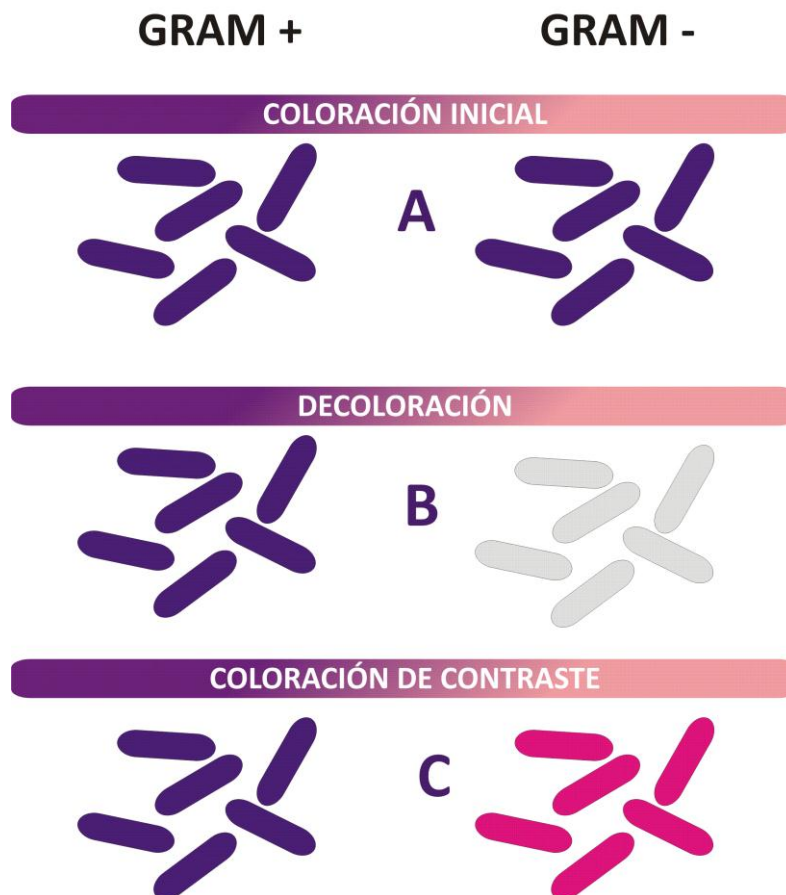


Figura 4. Representación comparativa de la tinción de Gram en bacterias Gram+ (izquierda) y Gram- (derecha), mostrando el estado de la coloración en cada proceso.

La tinción de Ziehl-Neelsen (Fig. 5), se basa en que ciertos microorganismos no son desteñidos con alcohol ácido si han sido previamente teñidos con fucsina fenicada (Fig. 5 A y 5 B). A estos microorganismos se los denominan ácido-alcohol resistentes. Una vez realizada la decoloración con esta mezcla se utiliza un colorante de contraste (azul de metileno) para poder observar las células sensibles a la decoloración con alcohol ácido (Fig. 5 C). Son microorganismos ácido-alcohol resistentes las micobacterias, debido a la composición de su pared celular (con ácidos micólicos). Esta tinción tiene interés desde el punto de vista del diagnóstico clínico puesto que algunos microorganismos patógenos son ácido-alcohol resistentes, tales como *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *Nocardia sp.* y Criptosporidios.

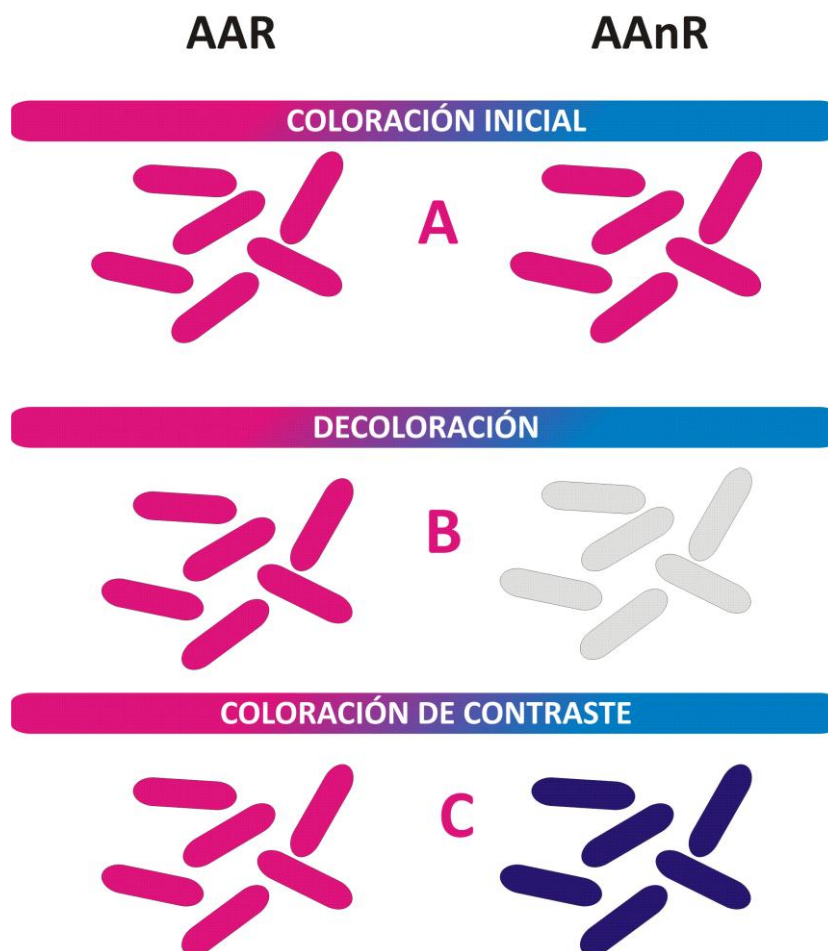


Figura 5. Representación comparativa de la tinción de Ziehl-Neelsen en bacterias ácido alcohol resistentes (izquierda) y ácido alcohol no resistentes (derecha), mostrando el estado de la coloración en cada proceso.

Al igual que las tinciones diferenciales, las tinciones selectivas se basan en el hecho de que distintas estructuras celulares tienen distinta composición química, de modo que se tiñen selectivamente con ciertos colorantes. Son ejemplos de tinciones selectivas: Tinción de esporas (Fig. 6), de flagelos, y de corpúsculos metacromáticos. Dependiendo

del caso pueden utilizarse uno o más colorantes. En la presenta actividad prestaremos atención únicamente a la tinción de esporas. Esta técnica se fundamenta en que ciertos grupos de bacterias producen esporas de resistencia cuya pared celular es característica. La tinción de esporas permite detectar este tipo de estructuras, lo cual es de gran utilidad a la hora de la identificación del microorganismo en estudio.



Figura 6. Etapas de la tinción de esporas. A y B. Coloración inicial. C. Coloración de contraste.

Procedimiento

- Tinción de Cápsulas por Método de Burri (ejemplo de tinción negativa). Procedimiento (Fig. 7): en el extremo de un portaobjetos colocar una gota de nigrosina o tinta china especial para bacteriología y una gota de igual volumen de un cultivo líquido, y mezclar con el ansa (Fig. 7 A). Extender con el borde de un portaobjetos, dejando que el líquido se extienda para formar una película delgada (Fig. 7 B). Dejar secar (Fig. 7 C). Observar por inmersión, bajando el condensador del microscopio para reducir la luz. Las cápsulas (Fig. 8) se observan como un halo claro sobre un fondo oscuro. Este método se fundamenta en que la cápsula desplaza las partículas de carbono coloidal de la tinta china y aparece como un halo claro alrededor de los microorganismos que presentan capsulas.

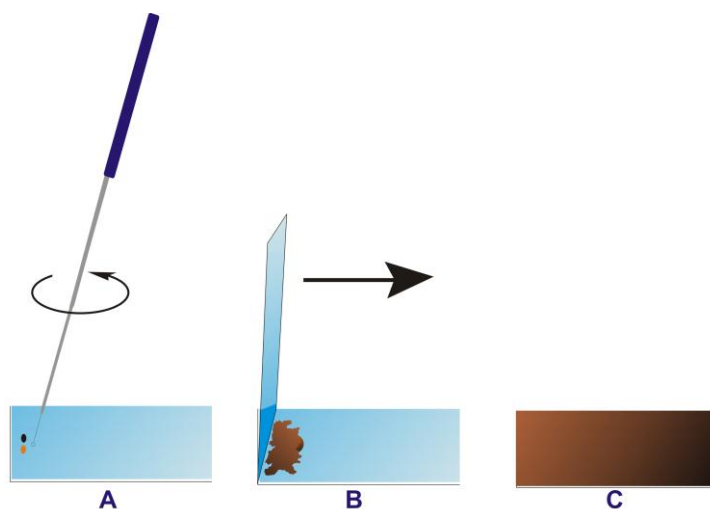


Figura 7. Pasos del Método de Burri para tinción capsular. A. Mezclado. B. Extensión. C. Secado.



Figura 8. Diferenciación de Cápsulas al Microscopio óptico. A. Microfotografía. B. Esquema.

- Tinción de Gram (ejemplo de tinción diferencial): requiere cuatro soluciones, primer colorante, solución mordiente, agente decolorante y un segundo colorante. Procedimiento (Fig. 9).

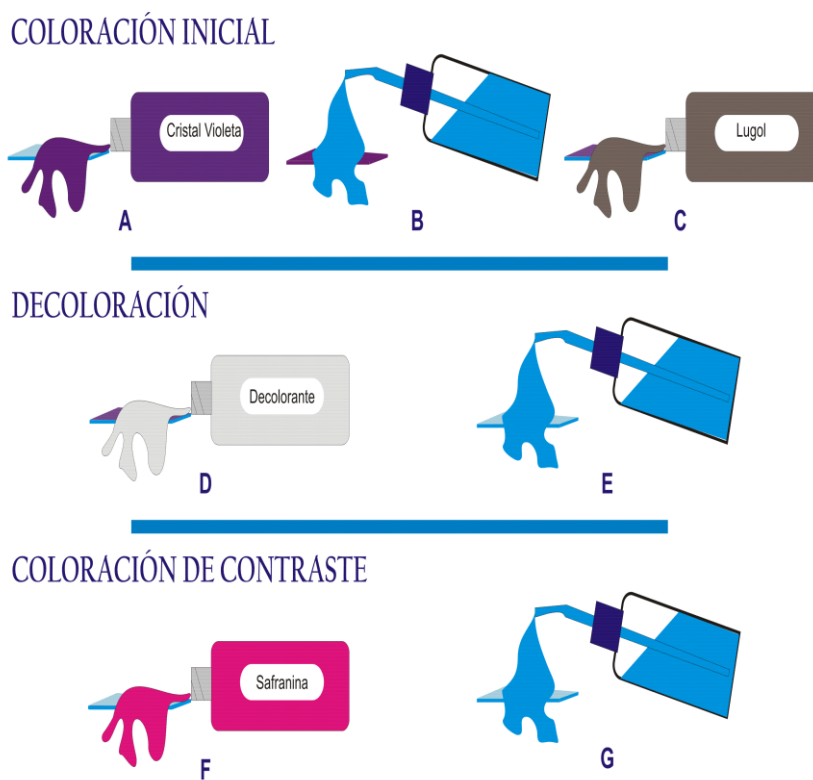


Figura 9. Procedimiento de la coloración de Gram. A-c. Coloración inicial. D y e. Decoloración. F y g. Coloración de contraste.

Cubrir la muestra con el primer colorante (cristal violeta) durante un minuto (Fig. 9 A); lavar suavemente con abundante agua destilada para eliminar el exceso de colorante (Fig. 9 B). Colocar lugol durante un minuto (Fig. 9 C), este actúa como solución

mordiente por su afinidad con el colorante cristal violeta. La decoloración se realiza agregando suavemente gotas de alcohol-acetona de forma continua por alrededor de treinta segundos (Fig. 9 D), transcurridos los cuales se procesa a lavar enseguida con abundante agua (Fig. 9 E). Finalmente cubrimos la preparación con un segundo colorante durante un minuto (Fig. 9 F). Lavar con abundante agua (Fig. 9 G), dejar secar y observar a inmersión en el Microscopio.

- Tinción de Ziehl-Neelsen (Fig. 10): requiere tres soluciones (primer colorante, agente decolorante y un segundo colorante). Procedimiento: a partir de un cultivo puro de *M. luteus*, realizar un frotis y fijar por calor la muestra. Cubrir la muestra con un trozo de papel de filtro y sujetarlo con una pinza. Colorar el primer colorante (fucsina fenicada) empapando el papel (Fig. 10 A). Tomando las debidas precauciones exponer la preparación a la llama del mechero hasta notar emisión de vapores, repetir si es necesario cinco minutos (Fig. 10 B); quitar el papel y lavar suavemente con abundante agua destilada (Fig. 10 C). Añadir gotas de alcohol ácido y esperar treinta segundos (Fig. 10 D). Lavar con abundante agua (Fig. 10 E). Teñir con azul de metileno y dejar actuar dos minutos (Fig. 10 F); lavar la muestra con abundante agua (Fig. 10 G), dejar secar y observar a inmersión en el Microscopio.

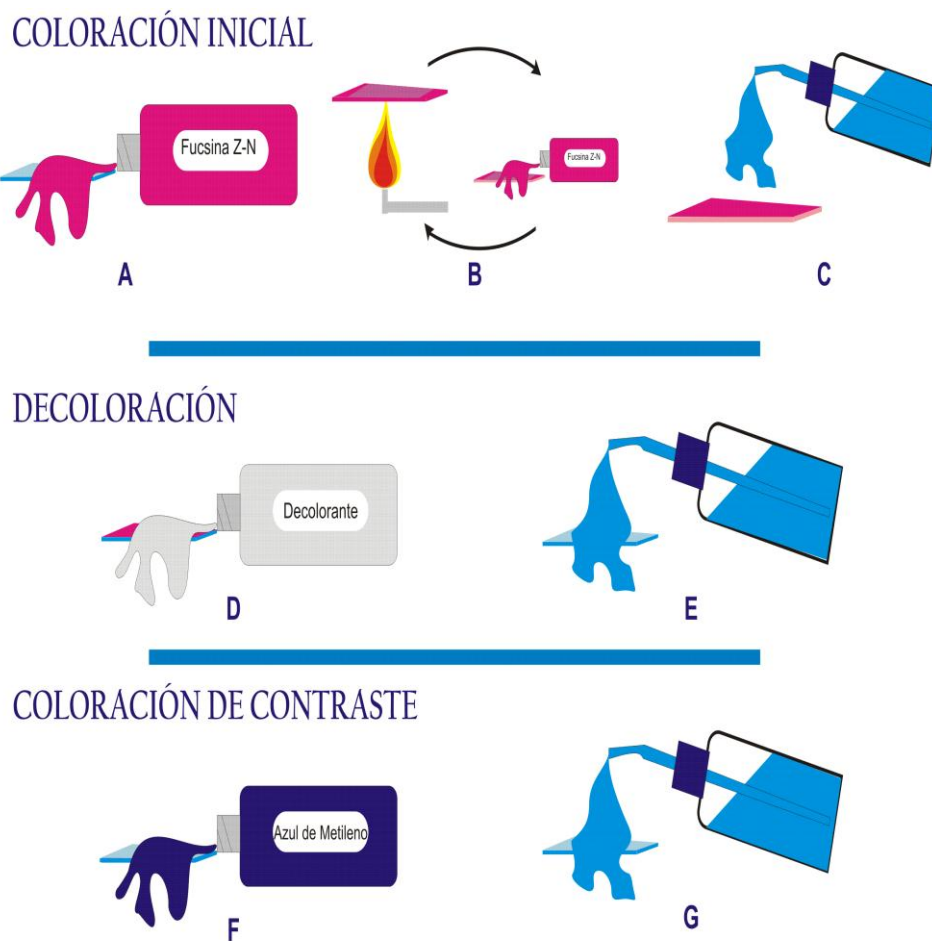


Figura 10. Procedimiento de Ziehl-Neelsen. A-C. Coloración inicial. D y E. Decoloración. F y G. Coloración de contraste.

- Tinción de esporas (ejemplo de tinción selectiva): requiere dos soluciones (primer colorante y segundo colorante). Procedimiento (Fig. 11): a partir de un cultivo puro de *Bacillus megateium*, realizar un frotis y fijar por calor la muestra. Cubrir la muestra con un trozo de papel de filtro y sujetarlo con una pinza. Colorar el primer colorante (verde de malaquita) empapando el papel (Fig. 11 A). Tomando las debidas precauciones exponer la preparación a la llama del mechero hasta notar emisión de vapores; cuando dejen de salir vapores volver a flamear, repetir agregando mas colorante si es necesario (Fig. 11 B) y dejar enfriar cinco minutos; quitar el papel y lavar suavemente con abundante agua destilada (Fig. 11 C). Teñir con safranina y dejar actuar un minuto (Fig. 11 D) y lavar la muestra con abundante agua (Fig. 11 E). Dejar secar y observar a inmersión en el Microscopio.

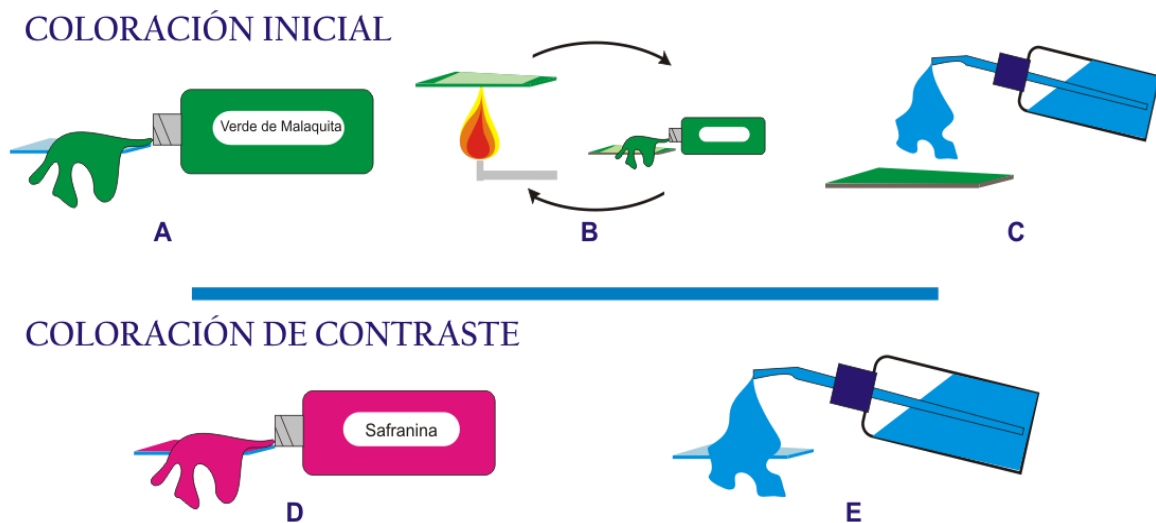


Figura 11. Procedimiento de Tinción de esporas. A-C. Coloración inicial. D y E. Coloración de contraste.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Las pruebas bioquímicas son muy importantes para la identificación taxonómica de microorganismos, y se basan en diferentes reacciones químicas que permiten poner de manifiesto las actividades enzimáticas presentes en los microorganismos analizados. A pesar de su tamaño microscópico los microorganismos poseen innumerables enzimas que aseguran sus funciones metabólicas.

El tipo y la cantidad de actividad de cada una de las enzimas presentes en un momento dado en el microorganismo, están determinados por un sistema genético de control. La mayoría de las enzimas se ubican intracelularmente. Algunos microorganismos (principalmente bacterias y hongos) excretan dichas sustancias al exterior.

Reacciones en el Agar Hierro Triple Azúcar: TSI (Triple Sugar Iron)

Esta prueba se recomienda para la identificación de patógenos entéricos Gram negativos. Se emplea para detectar la fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa, con formación de ácido y gas, y también para detectar producción de ácido sulfhídrico. Se emplea el medio TSI, cuya formulación esta detallada a continuación (Tabla 1).

Extracto de carne	3	g
Extracto de levadura	3	g
Peptona	15	g
Proteasa-peptona	5	g
Lactosa	10	g
Sacarosa	10	g
Glucosa	1	g
Sulfato ferroso	0,2	g
Cloruro de sodio	5	g
Tiosulfato de sodio	0,3	g
Rojo fenol	0,024	g
Agar	12	g
Agua destilada	1000	mL

Tabla 1. Composición del medio de Cultivo Agar-Hierro triple azúcar.

- Los pasos a seguir son los siguientes: colocar el medio en tubos de vidrio esterilizado e inclinar. Una vez que el medio solidificó realizar una punción en el taco y una estría en bisel. Incubar a 37°C durante 24 horas. Para la interpretación tener en cuenta los siguientes fenómenos (Fig. 12).
 - ✓ La falta de cambio en el medio de cultivo, indica que el microorganismo no es fermentador de azúcar, o sea que es incapaz de producir ácido por fermentación de glucosa, sacarosa o lactosa (Fig. 12 A).
 - ✓ La presencia de fermentación inicial del fondo y del pico del medio con posterior retorno del pico al color original (ya que se forman aminas alcalinas por descarboxilación oxidativa de proteínas cerca de la superficie), indica la presencia de bacterias que fermentan la glucosa (Fig. 12 B).
 - ✓ Una acidificación completa permanente del fondo y del pico revela la presencia de bacterias fermentadoras de lactosa y glucosa (Fig. 12 C).
 - ✓ El ácido sulfhídrico se detecta por la formación de sulfuro de hierro que se deposita en el fondo del tubo oscureciendo el medio (Fig. 12 D).

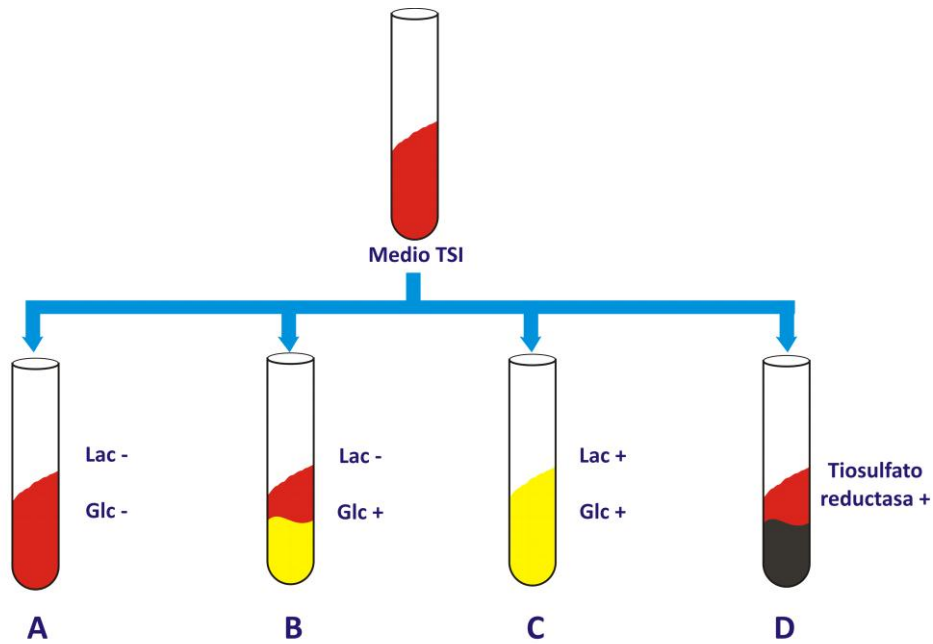


Figura 12. Pruebas de fermentación de azúcares y producción de ácido en medio TSI.

Respuesta enzimática (prueba de la catalasa)

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua.

Químicamente es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina. La mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad de catalasa.

La prueba se fundamenta en que el peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo aeróbico de los hidratos de carbono. Si se deja acumular, el peróxido de hidrógeno es letal para las células. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, previniendo la intoxicación celular. El procedimiento de la prueba se detalla a continuación:

- Transferir células del centro de una colonia bien aislada a la superficie de un portaobjetos, o si se trata de un cultivo líquido (caldo de cultivo). Añadir 1 o 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3% y observar si hay burbujeo. Se recomienda no añadir el microorganismo al reactivo, especialmente si se utilizan agujas o ansas que contienen hierro, ya que se pueden producir resultados falsos positivos.
- Para la interpretación tener en cuenta los siguientes fenómenos (Fig. 13): la rápida aparición sostenida de burbujas de gas o efervescencia, indica una reacción positiva. Dado que algunas bacterias pueden poseer enzimas distintas de la catalasa, capaces también de descomponer el peróxido de hidrógeno, unas pocas burbujas diminutas formadas a los 20 o 30 segundos no se consideran una prueba positiva.

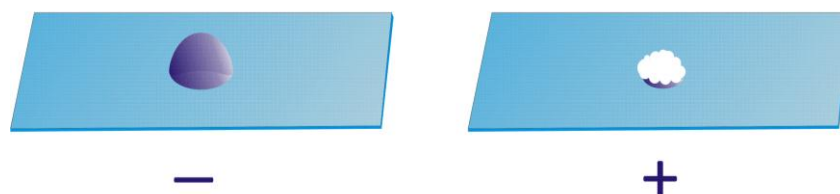


Figura 13. Prueba de actividad de la catalasa. Izquierda resultado negativo. Derecha resultado positivo.

Elaboración de Informe

Realice un informe indicando los tipos de microorganismos aislados en base a las técnicas de tinción empleados y a su respuesta a las pruebas bioquímicas, por ejemplo:

- Aislamiento de Suelo 1: Bacilos, Gram positivos, Ácido Alcohol no resistente, catalasa negativo, (se puede acompañar con fotografías de los preparados obtenidos).

BIBLIOGRAFÍA

Albarracín, V.H. 2007. *Estudios de los aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de la resistencia a cobre en cepas de Actinomyces*. Tesis Doctoral. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

Albarracín, V.H., Amoroso, M.J. & Abate, C.M. 2005. *Isolation and Characterization of indigenous copper resistant actinomycete strains*. *Chemie der Erde/ Geochemistry* 65(1): 145-156.

Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Costilow, R.N.; Nester, E.W.; Wood, W.A.; Krieg, N.R. y Phillips, G.R.. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker J. 1999. Brock: *Biología de los Microorganismos*. 8° Edición. Ed. Prentice Hall Iberia. Madrid. 1064p

Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker J. 2004. Brock: *Biología de los Microorganismos*. 10° Edición. Ed. Pearson Educación., Madrid. 1011p

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. y Clark, D.P. 2009. Brock: *Biología de los Microorganismos*. 12° Edición. Ed. Pearson Educación., Madrid. 1296p

Ordoñez, O.F., Flores, M.R., Dib, J.R., Paz, A. & Farías, M.E. 2009. *Extremophile culture collection from andean lakes: Extreme pristine environments that host a wide diversity of microorganisms with tolerance to UV radiation*. Microbial Ecology. 58(3): 461-73

Prescott, L., Harley, J., Klein, D. 2002. *Microbiology*. 5th Edn. McGraw-Hill. London. 950pp

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. 2007. *Introducción a la Microbiología*. 9° Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 988p

Recibido: 15 julio 2012.

Aceptado: 4 octubre 2012.