
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE AGRONOMIA



"CONCEPTOS BASICOS UTILIZADOS EN LA FITOPATOLOGIA"
BACTERIAS FITOPATOGENAS

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO EXTENCIONISTA

P R E S E N T A

EDUARDO LUGO MARTINEZ

GUADALAJARA, JALISCO MARZO 1989



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE AGRONOMIA

Sección

Expediente

Número

Febrero 13 de 1989

C. PROFESORES:

ING. ANDRÉS RODRIGUEZ GARCIA, DIRECTOR
ING. JOSE MA. AYALA RAMIREZ, ASESOR
ING. SERGIO HUANUAGUO ALVAREZ, ASESOR

Con toda atención me permito hacer de su conocimiento, que habiendo sido aprobado el Tema de Tesis:

" CONCEPTOS BASICOS UTILIZADOS EN LA FITOPATOLOGIA ".

BACTERIAS FITOPATOGENAS

presentado por el (los) PASANTE (ES) EDUARDO LUGO MARTINEZ

han sido ustedes designados Director y Asesores respectivamente para el desarrollo de la misma.

Ruego a ustedes se sirvan hacer del conocimiento de esta Dirección su Dictamen en la revisión de la mencionada Tesis. Entre tanto me es grato reiterarles las seguridades de mi atenta y distinguida consideración.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
EL SECRETARIO

ING. JOSE ANTONIO SANDOVAL MADRIGAL



SECRETARÍA DE AGRICULTURA
BIBLIOTECA

srd'



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE AGRONOMIA

Sección
Expediente
Número

Febrero 13 de 1989

ING. ANDRES RODRIGUEZ GARCIA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE

Habiendo sido revisada la Tesis del (los) Pasante (es)
EDUARDO LUGO MARTINEZ

titulada:

" CONCEPTOS BASICOS UTILIZADOS EN LA FITOPATOLOGIA "

BACTERIAS FITOPATOGENAS

Damos nuestra Aprobación para la Impresión de la misma.

DIRECTOR



ING. ANDRES RODRIGUEZ GARCIA

ASESOR

ASESOR



ING. JOSE MA. AYALA RAMIREZ



ING. SERGIO HUAMACO ALVAREZ

srd'

DEDICATORIAS

A mis padres:

María de Jesús Martínez.

Severo Lugo Estrada.

Con cariño y gratitud, que de ellos he recibido el apoyo moral y el amor en toda mi vida y han sabido guiarme en todo, para formarme como persona y profesionista.

A mis hermanos:

Mónica

Rita

Rafael



A mis abuelos:

A su memoria.

A mis abuelitos:

Angelina Zagati

J. Jesús Martínez.

A todos ellos, que sembraron en tierra fértil y que cultivaron con esfuerzo y desvelos mi formación educativa.

A mis compañeros y amigos.

Por todos los momentos gratos y difíciles que pasamos juntos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guadajajara;

A la Facultad de Agronomía .

Que me dió la oportunidad de buscar la verdad con completa libertad,
con sentido crítico y humanístico.

A mis maestros.

Que ejercieron su libertad académica motivándome a la verdad y
nada más que a la búsqueda de la verdad en su actividad docente.

Al Ing. Andrés Rodríguez García.

Por su verdadero apoyo y aceptación para la elaboración de éste
trabajo.

Al Ing. José María Ayala.

Por la dirección y asesoramiento para la realización de ésta tesis.

Al Ing. Sergio Huanaco.

Por su valiosa colaboración para la realización de la misma.

A todos los Ingenieros de ésta Facultad.

Doy Gracias por sus consejos y amistad.

INDICE

Antecedentes	1
Objetivos	7
Materiales y métodos	8
Generalidades de Fitopatología	8
Terminología	12
Características generales de las bacterias.....	15
Preparación de frotis bacterianos y coloraciones.	16
Tamaño de las bacterias	17
Medios de desarrollo de bacterias	18
Peso de las bacterias	19
Características de bacterias fitopatógenas	19
Estructura de las bacterias	20
Protoplasma - Citoplasma - Pared celular	24
Composición química del núcleo	25
Funciones del núcleo	25
Vacuolas	26
Fisiología de las bacterias	29
Características de las endosporas	32
Artrosporas	34
Clamidosporas	34
Reproducción Sexual	35
Crecimiento	37
Formación de colonias bacterianas	42
Colonias Lisas y Rugosas	44
Característica de las colonias Lisa	45
Rugosa	45

Métodos de tinción	46
Preparación de frotis	47
Fórmula de colorantes	47
Carbal Fucsina de Siehl.....	47
Cristal violeta.....	47
Cristal violeta en sol. alcohólica	48
Azúl de metileno alcalino de Laeffer.....	48
Azúl de metileno diluida en alcohol.....	48
Carbal-rosa de Bengala.....	48
Carbal Fucsina de Kingaun	49
Carbol Cristal violeta de Nicolle.....	49
Anilian - violeta de gencianade Ehrlich....	50
Solución de nigrosina de Dorner.....	50
Rojo congo de Benian.....	51
Coloración de Graham.....	51
Secuencia del teñido.....	53
Método de Zuhl - Neelsen.....	55
Tinción de esporas	56
Tinción de flagelos.....	57
Métodos de prepara los porta-objetos.....	57
Procedimiento de tinción.....	58
Respiración de bacterias.....	60
Nutrición.....	62
Fotosintéticos.....	62
Autotróficos.....	63
Heterotróficos.....	63
Enzimas.....	64
Reacciones de las bacterias.....	65

Infección lisogénica.....	67
Relaciones entre microorganismos.....	67
Relaciones ecológicas.....	68
Antibióticos.....	69
Conclusiones y recomendaciones.....	70
Resumen.....	71
Bibliografía.....	78

INTRODUCCION

La formación académica del fitopatólogo es de importancia fundamental en la agronomía, ya que es una de las cuestiones parasitológicas que más influyen en el desarrollo y productividad de nuestros cultivos.

Las perspectivas de la fitopatología según mi forma de pensar deben de contemplar un mayor número de cursos fitopatológicos que se concentren sobre el patógeno, ya que generalmente los cursos se concentran en enfermedades de cultivos; también es necesario hacer énfasis en el control de enfermedades, así como la formación fitopatológica debe tener como objetivos la capacitación, realizar prácticas, difundir tecnología, experimentar e investigar y difundir los objetivos del conocimiento de la fitopatología en sus diferentes niveles.

Se debe informar qué es la fitopatología y motivar ésta área. Es interesante que el alumno comprenda dentro de las técnicas fitopatológicas el diagnóstico, evolución, pruebas de patógenesidad, aplicación racional de principios integrales de control y que entienda con precisión los principios en que se basa la tecnología y debido a que en nuestra facultad se contempla ésta materia, fué mi pensamiento el de colaborar con una parte de la fitopatología que es la bacteriología y que tratará de enriquecer los aspectos teóricos del desarrollo de ésta rama que por ser el estudio de uno de los organismos más pequeños como son las bacterias, está poco investigado y desarrollado éste campo.

ANTECEDENTES

HISTORIA DE LA FITOPATOLOGIA.

Fitopatología es la ciencia responsable del estudio de las enfermedades vegetales y sus métodos de preservación y combate.

Mientras el hombre fue nómada, las enfermedades de las plantas lo afectaron poco pero cuando inició sus cultivos él mismo proporcionó los cambios ecológicos que favorecieron a los organismos fitopatógenos ya que el cultivo de muchas plantas del mismo tipo proporcionan condiciones para la rápida diseminación de la enfermedad, lo mismo que sembrar repetidamente el mismo cultivo.

Se cree que el primer reporte de las enfermedades fue en el año 4000 A.C., sufriendo los hebreos "pestes" en olivo, uva, trigo; Perseo 3500 A.C., Aristóteles 384 a 322 A.C. y Teofrasto 371 a 286 A.C., citan enfermedades en cebada y tratan de determinar las causas y aliviar algunas de ellas.

Ovid, 43 A.C. Trataba de prevenir el 19 de abril el ataque de la roya.

Luma Pompilio, segundo rey de los romanos estableció el 25 de abril, cuando el trigo espigaba plegarias por sacerdote libaciones de vino y sacrificaban un perro rojo que representaba a la roya, así por el estilo hasta 1650 cuando Yensen empezó a estudiar las enfermedades en forma más científica.

Hokke, 1653 a 1703, Describe la célula vegetal ayudando al estudio

de los patógenos 1675. Lecurenhoek descubrió las bacterias.

Michelli, 1721. En su obra plantaron Nova habla de la estructura de los hongos, ejemplo: las esporas y utiliza por primera vez la palabra micelio y puxinia que se refiere a las royas, además inóculos vegetales para ver si se transmitían y por eso es el padre de la Micología.

Linnæus, 1753. En su obra Species plantarum utiliza el sistema binominal para denominar técnicamente a los organismos.

Tillet, 1775. Estudió el carbón cubierto de trigum que se llama tilletia carles inóculo, éste hongo y observó que las enfermedades se transmitían por lo que dedujo que era infecciosa y además hizo tratamientos en las semillas y redujo la infección.

Peerson, 1801. En su obra "Sinopsis metódica Fulgorum", describe hongos del tamaño de las royas y los carbonos.

Prevost, 1807. Observa que los hongos se transmiten por semilla y los combate con sulfato de cobre reduciendo las infecciones.

Fries, 1821 a 1832. Escribe su obra "Sistema Micologicum", para 1845 en Irlanda se presenta el tizón tardío de la papa ocasionando muchas muertes por hambre y emigración a otros países.

Anton de Bari, en 1853 lanzó su teoría del parasitismo señalando que los hongos son causantes de la enfermedad y no son resultado de ella. En 1861 investiga 'Teopydora infestaus', es el hongo causante

de la enfermedad de la papa y que se infecta a través de los estomas además descubre que la roya del tallo del trigo es heteórica y se le considera el padre de la Fitopatología.

Los hermanos Tulasne, 1853. Estudiaron que los hongos presentan diferentes tipos de esporas y por eso se le llama "polimórficos".

Roberto Koch, 1861. Publica sus postulados que hasta la fecha son la base para la investigación científica.

Kunn, 1862. Publica el primer libro sobre causas y control de las enfermedades de las plantas.

Las enfermedades no solo causan daños y movimientos a la población, sino que alteran los hábitos humanos, por ejemplo: en Inglaterra que se consumía café que venía de Zeiland, en 1870 le atacó la roya del cafeto y para 1892 no quedó ninguna planta, sin embargo la planta de "Té" se adaptó y se volvió de primera magnitud.

Mielardet, 1865. Descubrió el caldo Bardell; con sulfato de cobre, cal hidratada y cobre y se aplicó por primera vez sobre el Mildew de la vid plasmio para vitícola.

Riffen, 1905 a 1912. Estudió la resistencia de los cereales causado por Fusarium en algodonero.

Hericon y Stakman, 1916. Estudiaron las razas fisiológicas de la roya del tallo del trigo (Puccinia Graminis). En la actualidad siguen

los estudios de los hongos, principalmente en comportamiento fisiológicos y bioquímicos.

Bacterias.- Woroni (1876). Descubrió, aisló y envió a las bacterias nificantes.

Burr, 1880. Demostró que el tizón es ocasionado por una bacteria.

Sava tanil, 1887. Demostró que la bacteria de la agalla del olivo.

Smith, 1890. investigó sobre las bacterias que dañan la cucubitateas.

Nemátodos.

Needhan, 1743. Descubrió al primer nemátodo fitoparásito, que es el angina tristisin y por ello se le considera el padre de la nematología.

Berkeley, 1855. Observó que las agallas de las raíces de algunos son causados por nemátodos.

Kuhn, 1877. Descubre los nemátodos en tallos y bulbos.

Schacht, 1870. Descubre el inquistamiento de los nemátodos en betabel.

Coob, 1932. Estudió nemátodos fitoparásitos sobre morfología,

taxonomía y metodología de estudio.

Virus.

Maller, 1886. Descubre el mosaico del tabaco, lo reproduce, lo transmite con infecciones pero no los reporta como virus.

Ivanouski, 1892. Estudia el mosaico del tabaco pero lo reporta como si fuera toxina de una sola bacteria.

Beyjerinca, 1898. Infecta con sabia de planta enferma a plantas altas, sanas y los llamó contagio divum fluidum pero en trabajos posteriores ya se llaman virus.

Kausche, 1935. Observa las partículas víricas en el primer microscopio electrónico.

Stanley, 1935. Observó cristales de proteína infectivos de VMT (virus mosaicos tabaco).

Gibber y Schramm, 1956. Descubren la proteína que protege al virus y que puede ser removida y que la única función que tiene es la "RNA - ADN".

Viroides.

Diener, 1971. Señala que el tubérculo fusiforme a la papa es causado por una pequeña molécula de ácido ribonucleico que se multiplica

por sí mismo y que se llama "viroide".

Micoplasmas.

Doi y Asullama, 1967. Localizan cuerpos como de micoplasmas en el floema de plantas infectadas con chicharritas.

Ismie, 1971. Demuestra que los micoplasmas pueden ser combatidos con tetraciclina.

Davis, 1972. Observa un microorganismo helicoidal que se relaciona con el achaparramiento del maíz y que se llama espiroplasma.

Rickettsias.

Windsor y Black, 1972. Observaron Rickettsias en el floema de las plantas como el trebol, produciendo hojas deformes y se estudió que el agente transmisor era la chicharrita y sólo se encuentra en el xilema o floema de las plantas de los tejidos de conducción.



OBJETIVOS

- I. Que este material sirva de apoyo para maestros y alumnos de ésta y otras facultades de agronomía, en el caso de la bacteriología agrícola.

- II. Que este trabajo sensibilice a los alumnos de agronomía sobre una de las áreas que inciden directamente sobre el desarrollo, protección, calidad y cantidad de productividad agrícola.

- III. Que éste trabajo apoye las técnicas de tinsión que se sugieren; la microbiología básicamente en la bacteriología.



ESCUELA DE AGRICULTURA
BIBLIOTECA

IV. MATERIALES Y METODOS

GENERALIDADES DE FITOPATOLOGIA

FITOPATOLOGIA es el estudio de las enfermedades de las plantas, sus causas y la determinación de las medidas de control de estas enfermedades. Anteriormente, las enfermedades se consideraban castigos de los dioses y no se sabía las causas de éstas; se inventaron los lentes (Hook), luego los famosos trabajos de Pasteur y Koch; posteriormente, Anto de Barg demostró la patología de hongos en plantas y así fue naciendo la Fitopatología.

Se cree que Disney y Singer inventaron simultáneamente y por separado el microscopio compuesto, fueron zacarías Jensen (en Holanda) y Galileo los primeros que descubrieron el microscopio entre los años de 1600 y 1610; el segundo en 1609 trabajando en Italia.

Robert Boylec afirmó lo siguiente:

El que comprende a fondo la naturaleza de los fermentos y de las fermentaciones, estará mejor capacitado para dar una explicación razonable de los diversos fenómenos de varias enfermedades, las cuales quizá nunca serán comprendidas por completo, sin penetrar a la doctrina de la fermentación.

Pierre Borrel y Anasthacius Kinchera observaron las bacterias, esto sucedió antes que las observaran Leeuseen Hoeck (que se acepta como descubridor en 1676) padre de la bacteriología.

Ray en 1688, primera persona que aplicó el término parásito, pero él se estaba refiriendo al muerdago; Duhamel aplicó el término aun hongo en 1728, Rhizoctonia crocorum y fue capaz de demostrar que se desarrollaba en el bulbo del azafrán (cuscuta).

Las enfermedades se consideraban a muchos factores: clima, lluvias, neblina, luna, etc., pero muchas personas con ideas evolucionadoras, creyeron que se debían a organismos pequeños y que para corregirlas se comenzaron a aplicar ciertos compuestos, como para controlar el carbón del trigo, se comenzó a aplicar salmuera. Hay quienes aseguran que en 1960 en Ruin Francia, hubo peticiones que existiera y exigiera; se destruyera los matorrales de agracejo (mahonia y Berberis) hospederas del chahuistle, porque ya se tenía idea que en ella se desarrollaba los chahuistles; en U.S.A. en 1726 en Connecticut se promulgó una ley estatal donde era de ver, destruir este tipo de matorrales; en 1705 el francés Tourwfort, clasificó las enfermedades en internas y externas, pero sin ninguna explicación; en 1743, Needham aplastó un grano de trigo y encontró lo que él llamó gusanos acuáticos, que en realidad era el nemátodo Angina tritici, esto reforzó la idea de la legación espontánea.

Linneo en 1758 creó el grupo de clasificación "Vermes" incluía las bacterias y organismos inferiores y un poco después Urisberg les llamó infusorios al grupo Vermes.

En 1775 Tillet hizo los primeros experimentos agronómicos a pesar de ser un oficinista; este señor trabajó con el tra carbón del trigo (polvo negro); al aplicar a semillas sanas produciendo la enfermedad; la dividía en dos partes y a una le aplicaba "salmuera" o agua de cal

y la semilla tratada presentaba menos la enfermedad y decía que en el polvo negro existía un ente; también demostró que la enfermedad era contagiosa y transmitible.

En el año de 1776 un italiano Fontana indicó que los chahuistles, eran un organismo diferente de la planta que estaba dañada; por ese mismo tiempo Anderson describió una enfermedad, que hoy se conoce como vibrosa y se le llama degeneración de la papa y descubrió que se transmitía por el tubérculo y que era muy semejante a la viruela en virulencia.

En el año de 1773 O.F. Muller hizo la primera clasificación de infusorios; el primero en mostrar que los organismos son patógenos en las plantas, fue Prevost y trabajó con carbón del trigo y en 1807 publicó resultados de sus trabajos, describió el ciclo de la enfermedad, citó el control de la enfermedad que había hechos con sales de cobre, definitivamente marcó la muerte de la teoría de la generación espontánea, a la teoría de Prevost se le acepta después de 40 años, cuando Ré y Unger presentan trabajos semejantes; en 1829 Ehrenberger comenzó a difundir una serie de publicaciones de las bacterias y usó por primera vez el término bacterium, que viene de bacterion y que a la vez es diminutivo de bacteron que significa bastón, debido a que las diferentes formas de bacterias tienen forma de bastón y sugirió el uso de otros términos Spirillum, Spirochacta.

En 1847 los hermanos Tulasne presentaron trabajos que apoyaron los de Prevost.

En 1853 vino a nacer propiamente la Fitopatología con los trabajos

de Bary y trabajó con la enfermedad del tizón tardío de la papa.

El primero que propuso que las bacterias fueran consideradas como vegetales fue Cohn en 1854; en 1857 Nageli correlaciona hongos y bacterias y propuso el grupo de los Schizomycetes.

En 1866 un ruso descubrió las bacterias de los nódulos de las raíces de las leguminosas (fue Woronin-ruso); en 1878 Burrell estudió y escribió la primera enfermedad bacteriana que él llamó MICROCOCCUS AMYLOVORA y hoy la conocemos como Erwinia amylovora y un norteamericano comprobó esa teoría. en 1867.

Los postulados de Koch, el primero que sembró en un cultivo artificial en 1882 y lo hizo por uno de sus maestros Jacobo Henle, cultivó el antrax.

- 1.- El patógeno debe estar presente en el animal enfermo y aislarse.
- 2.- Este patógeno debe multiplicarse en cultivo puro artificial.
- 3.- Deberá producir la enfermedad al inocularse en un animal sano susceptible.
- 4.- Deberá aislarse el animal que infectó nuevamente.

En 1829 Twanowsky demostró la existencia de los virus trabajando con la enfermedad mosaico del tabaco y la hizo inoculando savia de las plantas enfermas en plantas sanas, la savia la había filtrado a pruebas de bacterias o filtro de bujía y a raíz de esto se le llamó virus filtrable o fluvió venenoso.

TERMINOLOGIA

Enfermedad de una planta.- es cualquier cambio en su estructura o fisiología normal causada por un factor desfavorable del medio ambiente, algún agente patogénico o una combinación ambos.

Complejo causal.- Es el agente que causa la enfermedad.

Sistema.- Son las manifestaciones externas características que se presentan sobre la planta para una enfermedad dada.

Parásito.- Es un organismo que vive total o parcialmente sobre un tejido vivo.

Saprófito.- Es aquel organismo que subsiste sobre una materia orgánica muerta o en proceso de descomposición.

Parásito obligado.- Es aquel organismo patógeno que pudiendo subsistir en forma de esora fuera de su hospedera es necesario que parasite para poder completar su ciclo bilógico.

Parásito facultativo.- Es aquel organismo particularmentesaprófita, que posee facultades débilmente; patógenas; las cuales se manifiestan cuando ciertas condiciones desfavorables predisponen al hospedero y lo hacen susceptible.

Saprófito facultativo.- Es aquel organismo particularmente parásito, pero que tiene capacidad de vivir como saprófito, aunque no puede completar su ciclo de vida fuera de su hospedera.

Saprófito obligado.- Es un organismo que no tiene relación con células vivas, consiguiendo sus nutrientes de tejidos orgánicos muertos o de materiales orgánicos a su disposición.

Patógeno.- Es un organismo capaz de causar una enfermedad. Este término se usa casi siempre para indicar la entidad viva o viviente

en el complejo causal.

Patogénesis.- Es el proceso o cadena de eventos que intervienen en el desarrollo de una enfermedad.

Patogenesidad.- Es la propiedad de un organismo por medio de la cual se convierte en parte del complejo causal.

Hospedero.- Es el término que se usa para nombrar a una planta enferma, cuando un organismo vivo forma parte del complejo causa.

Susceptibilidad.- Indica cuando una planta está sujeta a una enfermedad dada, ocasionada por un complejo causal determinado.

Inóculo primario.- Es la forma o estado invernante o latente de un organismo causal que se convierte en agente de infección, cuando una planta hospedera se enferma el organismo causal produce una nueva generación de cuerpos infectivos a esto se le lla inóculos secundarios y sirven para producir nuevas enfermedades infecciosas o infecciones secundarias.

Inoculación.- Es el transporte del inóculo hasta el lugar donde se produce la infección. El inóculo puede transportarse por aire, agua y hombre.

Penetración.- Es la entrada del inóculo en la planta hospedera, puede llevarse por estomas, plasmodemos, lenticelas y horidas.

Infección.- Implica el establecimiento del patógeno dentro de la panta hospedera, el proceso comienza cuando el patógeno logra obtener sus nutrientes del hospedero y termina cuando se establece como parásito.

Período de incubación.- Ordinariamente después de la infección transcurre un período para que aparezcan los primeros síntomas de la enfermedad y se conoce como período de la inoculación.

En la práctica se toma el tiempo que transcurre desde la inoculación comprendiendo la germinación del inóculo, crecimiento e infección debido

a que es muy difícil determinar con exactitud el tiempo en que el parásito comienza a establecerse en la planta hospedera.

Organismo infeccioso.- Es aquel que puede transmitirse de una planta enferma a una sana y causar enfermedad bajo condiciones favorables del medio ambiente.

Enfermedad infecciosa.- Es aquella en la que un organismo transmite forma parte del complejo causal.

Predisposición.- Es el efecto de uno o más factores del medio ambiente que hacen que una planta sea susceptible al ataque de un patógeno.



ESCUELA DE AGRICULTURA
BIBLIOTECA

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS

1o.- Todas las bacterias como los hongos carecen de clorofila por eso no pueden elaborar sus alimentos y necesitan los mismos nutrientes que las plantas nutrientes.

2o.- Las bacterias pueden ser parásitas, saprófitas o saprófitas facultativas.

3o.- Las bacterias según su forma se pueden dividir en: COCOS, BACILOS Y ESPIRILOS.

Se le da el nombre de Cocos a las bacterias casi esféricas, Bacilos que tienen forma de bastón recto; Espirilos en forma de bastones curvados.

4o.- Las bacterias pueden presentarse en forma aislada o agregados formando una colonia, pero su fisiología actúa independiente.

En el caso de Cocos puede suceder que están agrupados de dos en dos y se llaman diplococos. Si son cuatro se llama tetrada.

SARCINA: Es un agregado de forma cúbica aproximado, sin estar bien delimitadas sus aristas.

ESTAFILOCOCO: Es un grupo en forma esférica o de racimos de uvas.

ESTREPTOCOCO: Formación de hileras o cadenas.



ESCUELA DE AGRICULTURA
BIBLIOTECA

PRACTICA No. 1

PREPARACION DE FROTIS BACTERIANOS Y COLORACIONES.

OBJETIVOS.- Este ejercicio tiene por objeto ensayar la técnica para preparación de frotis y su tinción con colorantes simples más usuales.

MATERIALES.- Porta objetos, asa de platino, gradilla para cultivos, mechero bunsen o lámpara de alcohol.

SUSTANCIAS.- Agua destilada, cultivos bacterianos de 24 horas de edad, colorantes entre ellos safranina, azul de metilo, fuscina diluida y cristal violeta.

TECNICA. 1.- Preparación de un frotis para la tinción, éste es un paso muy importante que deberá llevarse a cabo con cuidado, ya que de ellos depende el éxito de las tinciones.

Un frotis no debe de tener un gran número de bacterias, la cantidad que debe usarse lo da o se adquiere con la práctica.

a) Limpiar perfectamente el porta-objeto y flamearlo ligeramente para tibiarlo.

b) Colocar una gota de agua destilada estéril en la parte media del porta-objeto.

c) Con una asa estéril transferir una cantidad adecuada de cultivo, que se desee examinar y mover para obtener una suspensión en la gota de agua.

- d) Dejar secar al aire hasta que el frotis se torne opaco.
- e) Fijar el frotis, pasando rápidamente el porta-objetos sobre la llama del mechero, se deja enfriar y se tina.

2.- Para los colorantes se usan los puntos siguientes:

Para la Fuscina diluída un minuto, para el cristal violeta 1 minuto, 1 a 3 minutos para el azul de metileno y 3 minutos para la safranina.

3.- Lavarlos al chorro de agua y se dejan secar al aire enseguida observamos en el microscopio de inmersión poniendo un cubre-objeto y agregar aceite de cedro.

PRACTICA No. 2

TAMAÑO DE LAS BACTERIAS

MATERIALES.- Protis bacterianos, micrómetro ocular y micrómetro objetivo.

TECNICA. 1.- Coloque el objetivo micrométrico en la platina del microscopio, enfoque con el objetivo débil, coloque entonces el micrómetro ocular y haga que las escalas de los dos micrómetros coincidan o queden paralelas, ponga dos líneas coincidiendo exactamente y cuantice los espacios intermedio hasta que vuelvan a coincidir otras dos líneas, a esas líneas les llamamos coeficiente microscópico. La escala del ocular micrométrico tiene una longitud desconocida según sea el aumento

que usemos y está dividida en 100 partes, el micrométrico del objetivo mide 2 milímetros divididos por 200 partes, sustituya el micrométrico objetivo por la preparación y contar el número de divisiones que ocupe el cuerpo multiplicado por el coeficiente microscópico y nos da la longitud del cuerpo en micras.

MEDIOS DE DESARROLLO PARA BACTERIAS

Se han logrado aislar bacterias a 7 km. de altura, en los polos, en los océanos a 5 km.,. Se considera que un gramo de suelo agrícola hay 100 millones de bacterias.

Las bacterias saprofiticas las podemos encontrar en el suelo, aire y agua las parásitas alimentándose de tejidos vegetales y animales; y las simbióticas, asociadas con otros organismos.

Las condiciones de temperaturas son de 0-40°C.

TAMAÑO DE BACTERIAS.- Haya gran variación en cuanto a tamaño; podemos encontrar que dentro de una especie hay variaciones en tamaño; para medirlas se usa la medida de micra o micrón; Una de las bacterias más pequeñas es *Spirillum parvum* y mide de 0.1-0.3 micras por 1.0-3.0 micras; el caso opuesto de *Beggiotoa gigantea* 35-40 micras por 2-3 cm de longitud; en la generalidad y caso de los cocos 0.5-1 micra de diámetro; en el caso de los bacilos, ancho de 0.5-1 M y longitud 2-4 M.

En medio de presión osmótica equivalente para las medidas de ciertas bacterias en el cual la presión osmótica no influye en el tamaño.

PESO DE LAS BACTERIAS.- Las bacterias en su composición tienen de 75 a 80% de agua y su peso específico 1.04-1.10.

Una bacteria de 0.6 M de ancho por 3.5 M su peso es igual a 1X10 gr.; Una bacteria puesta en un cultivo al reproducirse en 24 horas puede llegar a pesar 28.5 gr. Suponiendo que no hay restricciones de alimentos, luz, humedad, temperatura y en general medio ambiente, su tamaño al cabo de una semana sería del tamaño de la tierra.

MORFOLOGIA DE LAS BACTERIAS.- En general la forma para una especie determinada es constante.

Polimorfismo-Pleofórmicas.- Formas de involución.- Diferentes formas de una especie en diferentes condiciones del medio ambiente.

Plasmolisis cuando un cultivo ha perdido agua y lo contrario es la plasmoptesis.

CARACTERISTICAS DE BACTERIAS FITOPATOGENAS

- 1.- La forma de bastón o bacilo sin excepción.
- 2.- Las bacterias fitopatogénicas generalmente son aisladas, no forman agregados.
- 3.- El tamaño es de 0.4-1.7 M de ancho por 0.5-2M de largo.
- 4.- Bacterias inmóviles y móviles con flagelos; en general las bacterias fitopatogénicas no forman esporas; especies de streptomyces causa enfermedad en la papa que si forma esporas, grupo intermedio de hongos y bacterias.

- 5.- Son bacterias aerobias estrictas o anaerobias facultativas.
- 6.- La temperatura óptima es de 27°C y la mínima es 0°C y máxima 37°C son temperaturas cárdenas o críticas. Se puede cultivar en medio de cultivos artificiales.
- 7.- Casi todas las bacterias fitopatogénicas son gran negativo; excepto el género *corynebacterium*; las que no se tiñen con colorantes de gran positivo.

ESTRUCTURAS DE LAS BACTERIAS.

En las bacterias existen una serie de envolturas opacas.

- 1°.- Primera capa se le llama capa *musilaginosa* o cápsula.
- 2°.- Pared celular.
- 3°.- Membrana citoplásmica o citoplasmática.

Algunas bacterias tienen uno o dos flagelos.

La cápsula no se encuentra en todas las bacterias y se le considera como consecuencia de las diferencias nutricionales. La cápsula es inherente a la herencia, pero es muy influenciada por el medio ambiente; es variable en grosor, composición química, en tinsión (tintarse) es difícil de teñirse, existe una excepción que es *microbacterium tuberculosis* que es fácil de teñirse.

La composición química de la cápsula; unas por policáridos polisacáridos que no contienen proteínas, por ejemplo: *Rhizobium radisicola*; la otra composición está formada por polipéptidos, diferentes clases de proteínas.

Para teñir la cápsula es por el método de nanyau que utiliza un mordiente (ácido tánico más sulfato de potasio y aluminio) y usar el colorante de Ziel-Nielsen.

Función de la cápsula de protección contra el medio ambiente de factores dañinos; en casos extremos la cápsula puede servir como alimento ya que se reabsorve.

En algunas bacterias pierde la cápsula y pierde la virulencia, eso sucede en forma general.

PARED CELULAR.- Está en contacto con la membrana citoplasmática, es más gruesa y elástica que ésta; la composición química de la pared celular varía de especie a especies, está formada por glúcidos complejos como celulosa, hemicelulosa, quitina y algunos ácidos nucleicos; la pared celular presenta consistencia viscosa, las colonias bacterianas son blandas y pegajosas; la pared celularr presenta algunas características físicas, presenta rigidez, elasticidad, se agranda cierto límite al ponerse la bacteria en agua destilada.

a).- DUCTIBILIDAD.- La pared celular consiste de sustancia muy resistente a la autólisis (es la desintegración de un organismo por sí mismo); es difícil para colorearse y los colorantes más apropiados son la fucsina básica y violeta de metilo. La pared celular sirve como protección; controla los cambios de materiales del medio interno y externo (ósmosis), actúa sobre la actividad metabólica; la rigidez ayuda a mantener la forma característica de la bacteria.

b).- MEMBRANA CITOPASMÁTICA.- Se encuentra rodeando al protoplasma que es extremadamente fina, elástica y permeable.

Está formada por lipoides y lipoproteínas, esta membrana citoplásmica se va formando a medida que se desarrolla la bacteria. La membrana citoplasmática se tiñe fácil y uniforme y la parte de la célula resiste más a la decoloración.

Funciones.- En ellas se inicia la función celular, influye en la permeabilidad celular, actúa como barrera para no perder agua, protege a la célula de autólisis y bacteriófagos.

c).- PROTOPLASMA.- De naturaleza viscosa y composición química protéica, en combinaciones muy complejas con nitrógeno, carbono y pequeñas cantidades de otros elementos; el protoplasma raramente es de composición homogénea, sino de composición granular con las inclusiones, que se cree son sustancias de reserva como glóbulos de grasa, glicógeno (almidón de origen animal), ácidos grasos, valutina, etc.; éstos gránulos pueden ser tipo macromático (con cualquier colorante se puede teñir) y con diferente color, de que tiene colorante del que estamos usando, durante una fase de crecimiento se tiñe fácilmente con rango de P.H. más amplio, el protoplasma en esta fase es hiperromatino hiperromatónico.

Funciones.- Contiene todas las enzimas celulares, recibe los nutrientes del medio ambiente, mantiene las condiciones físico químicas adecuadas para la estabilidad de los constituyentes que entran en las funciones metabólicas y procesos de crecimiento.

d).- NUCLEO.- Algunos investigadores dicen que no tienen núcleo y otros que sí, éstas ideas se pueden agrupar en 5 criterios.

- 1.- No hay núcleo.
- 2.- La bacteria es un núcleo desnudo.
- 3.- Material nuclear en forma difusa.
- 4.- Bacterias con un cuerpo central.
- 5.- Las bacterias tienen uno o más núcleos.

Las personas que apoyan el primer criterio, porque son organismos muy inferiores, que no tienen núcleo y dicen que las personas que reportan núcleo es sólo una condensación del protoplasma. Debido al calor, a los colorantes que se aplican para estudiarse.

1o.- CRITERIO.- No son tan primitivos, porque pueden reproducirse cada 20 minutos, en realidad no es un organismo muy primitivo y producen sustancias nutritivas igual a su peso en una hora.

2o.- CRITERIO.- Cuando se colorea la bacteria para ver el núcleo toda se colorea uniformemente.

Las bacterias tienen funciones propias y atributos especiales, entonces no podemos tomar este criterio.

3o.- CRITERIO.- También se han basado en que se obtienen al teñir una bacteria, se encuentra en lugares que se colorean más intensamente porque es material difuso del núcleo.

Pero no puede ser esto porque el núcleo debe albergar el material genético y esto no podría transmitirse. Si estuviera difuso se notaría una gran variabilidad entre una misma especie.

4o.- CRITERIO.- Casi aceptar que existe el núcleo, que existe el material condensado y que no existe la membrana nuclear.

5o.- CRITERIO.- Se acepta núcleo y que éstos núcleos adquieran diferentes formas, dentro de una misma célula bacteriana.

Feulgen y Rosenbec 1924 después de muchos trabajos lograron demostrar el núcleo en las bacterias, por la reacción de Feulgen y éstas se basan por las diferentes reacciones de las proteínas que se encuentran en el citoplasma y el núcleo.

PROTOPLASMA - CITOPLASMA - PARED CELULAR.

El ácido ribonucléico se hidroliza y la desxiribosa y se colorea con el colorante de Skiff (colorante usado para identificar azúcar) nos indica que hay presencia de aldeídos; por otro lado la D-ribosa que se libera del núcleo no se colorea con el reactivo Skiff.

Actualmente se usa ácidos minerales y hacer hidrólisis lacromatina del núcleo toma color violeta y el citoplasma no se colorea.

Otra técnica es eliminar el citoplasma, pero necesita equipo apropiado o también por hidrólisis, por medio de encimas o por remoción fisiológica. Observando Nycobacterium tuberculosis, Schorichia coli, el núcleo

es ligeramente redondo o elipsoidal y que consiste en núcleo de una capa de cromatina y de una médula o corazón, esta se tiñe con el color rosa del colorante de Geimsa y le han llamado nucleoplasma (médula); en las bacterias no se ha podido observar la membrana nuclear.

COMPOSICION QUIMICA DEL NUCLEO.

En la actualidad las reacciones de coloración con el núcleo bacteriano, que es muy similar al núcleo de plantas superiores. Investigador que ha inventado la composición química; Knayasi, Tulesne, Fabricant y han encontrado que la cromatina contiene proteína más ácida de desoxirribonucleico (ADN) y está ligado un material lípido que es la colesiterasa, algunas veces indica una variación cromática en las diferentes especies.

La dimensión del núcleo es variable, varías de acuerdo con la edad de la bacteria; y en *Staphilococcus flavocyonus*, ocupan del 5 al 6% el tamaño total del volumen de la bacteria (citoplasma) en estado de reposo; y en crecimiento activo del 13 al 15% ocupa; hay variabilidad.

FUNCIONES DEL NUCLEO

El núcleo es el material o lugar donde se encuentra detenido el material genético.

INCLUSIONES. Son sustancias o partículas puras que están en solución o en suspensión dentro del citoplasma. Pueden ser orgánicas o inorgánicas.

Orgánicas.- Carbohidratos, materiales lipoides y diferentes compues-

tos de nitrógeno.

Inorgánicas.- Azufre, carbonato de calcio, etc.

Se considera que la inclusiones son un coproducto o residuo del proceso de crecimiento y en algunas ocasiones pueden ser utilizadas como alimento y se consideran como materiales de reserva.

Las inclusiones se usan en taxonomía de las bacterias, infusiones de azufre se llama el grupo de bacterias azufrosas.

- V A C U O L A S -

Inclusiones citoplasmáticas que contienen materiales de reserva y generalmente están rodeadas por una membrana llamada TONOPLASMA. Las vacuolas no son partes constitutivas de la bacteria; y son el resultado de la condensación del citoplasma, ya sea como resultado de la acción del medio ambiente o como resultado de la actividad metabólica de la propia célula.

En Mycobacterium tuberculosis puede haber hasta 20 vacuolas, que pueden desplazar al núcleo en tiabacillus thioooxi, hay una sola vacuola.

La función de las vacuolas, regularización de la presión osmótica y esto se comprueba al poner bacterias en una solución hipertónica, las vacuolas tienden a desaparecer; reguladoras de la actividad metabólica.

MOVILIDAD.- Cuando se hacen preparaciones de bacterias se nota que se

mueven y lo hacen por la presencia de flagelos, por movimientos veniformes (movimiento que se observa en nemátodos) por contracciones rítmicas y por movimientos brownianos.

La décima parte de las especies bacterianas poseen flagelos, dotados de movimientos verdaderos.

En la actualidad la naturaleza de los flagelos no está bien definida; dicen que son prolongaciones del endoplasma, otros de cápsula, otras prolongaciones de la endoplasma punto con fibras.

Los flagelos por lo general son dos - tres veces el cuerpo de la bacteria y de grosor 0.02 μ ; el movimiento de flagelos es ondulatorio, pero no se sabe si jala o empuja a la bacteria.

La posición y el número de flagelos es constante en los individuos de una especie; entre especies difiere; este caracter es muy constante, tanto que Messee las clasifica por ésta característica en dos grupos:

Gimnobacterias.- No hay flagelos.

Trichobacterias.- Sí hay flagelos.

El número de los flagelos que presentan:

- a) Atricas.- Sin flagelos.
- b) Monotricas.- Un flagelo.
- c) Multitricas.- Dos o más flagelos.
- d) Anfítricas.- Un flagelo polar.

- e) Lofotricas.- Penacho de flagelos en uno de los polos.
- f) Lofo- Anfítricas.- Presencia de dos penachos polares.
- g) Parítricas.- Numerosos flagelos laterales.

Las bacterias esféricas no presentan flagelos (cocos), los bacilos la mitad son flagelados, los espirilos la mayor parte son flagelados; la mayor parte de las bacterias fito-patogénicas son flágeladas.

Movimiento versiforme.- Son el resultado de ondulaciones debidas a contracciones en la propia bacteria y causa alteraciones en la forma y volúmen ejemplo: Beggiotoa thiothrix.

Contracciones rítmicas.- Aquí no se modifica la forma y el tamaño.

Movimiento Brawniano o molecular.- Hay que distinguir dos procesos:

a) Al movimiento causado por la evaporación del líquido donde se encuentre.

b) Movimiento oscilatorio y vibratorio; las bacterias no pierden su posición relativa entre sí, la moléculas del líquido chocan contra las bacterias y las mueven.

Los factores que influyen en la velocidad del movimiento bacteriano. Son esencialmente la temperatura, edad y nutrición.

Las bacterias jóvenes tienen más movilidad que las bacterias viejas. Hay diferentes velocidades para diferente especie.

FISIOLOGIA DE LAS BACTERIAS

1.- Reproducción.- Puede llevarse a cabo por procesos simples; reproducción asexual y procesos más complicados por reproducción sexual.

A.- Reproducción asexual.

1.- Fisión binaria, bipartición, esquizogénesis.

2.- Gemación.

a) Ramificación.

b) Crecimiento filamentosos.

3.- Formación de un simplasma.

4.- Formación de esporas.

B.- Reproducción sexual.

1.- Conjugación de dos individuos.

2.- Conjugación de varios individuos.

Esquizogénesis.- Por dividirse por fisión se les da el nombre de Schizomycetes.

El proceso consiste en que la célula crece y al llegar a su madurez, se divide en 2 células más pequeñas que ellas; y cuando está próxima a dividirse se agranda y el protoplasma se desplaza hacia los polos y en medio de la célula comienza una construcción continua marcándose más hasta quedar una laminilla que resulta de condensación del citoplasma, que al principio es gelatinosa.

2.- Germación.- En algunas bacterias hay formación de yemas (de ahí el nombre) estas comienzan a agrandarse, hasta quedar la bacteria con

una yema, una vez formada esta puede continuar unida o despegarse y reestructurar las partes de la bacteria.

- a) Ramificación.- Da principio con formación de una yema y esta empieza a ramificarse en diferentes formas.
- b) Crecimiento filamentosos.- Yemas delgadas y forman caprichosas (bacilos). La gemación y sus modificaciones dan lugar a células y éstas son capaces de reproducirse por fisión.

3.- Reproducción por formación de un simplasma.- Esto se refiere a que Lohnis reportó que en una colonia se puede ver una desintegración de bacterias y forman una masa y a partir de esta masa amorfa puede regenerarse células bacterianas al tener condiciones adecuadas. Lo más probable es que queden algunas células bacterianas en la masa amorfa y no en realidad se reproduzca.

4.- Formación de esporas.- Fenómeno interesante y complicado en bacterias (esporas quiere decir semilla, porque los primeros bacteriólogos que los observaron que eran semillas de plantas superiores) Pasteur comprobó que hacía las funciones de la semilla. Los bacteriólogos consideran a las esporas como un estado de reposo, como sucede en amibas y metazoarios y que no es precisamente un estado de reproducción y lo dicen basado en, la formación de esporas depende más de la influencia de factores externos que de la fisiología de las bacterias. Esto es un debate.

Uno de los principales factores externos, es la acumulación de

materiales debido a la reproducción de las bacterias, en los procesos biológicos la reproducción se comprueba porque si se tiene una colonia en una caja de petri, todas esporulan al mismo tiempo; la esporulación empieza cuando la concentración de la secreción insita la reproducción de formación de esporas; si se tien un cultivo en un tubo y antes que se haga vieja se pone en otro tubo que tenga cultivo y así sucesivamente este cultivo no formará esporas.

Diferentes tipos de esporas de las bacterias.

- a) Endosporas.
- b) Artrosporas.
- c) Clamidosporas y microcistos.
 - 1.- Conidios y gonidias.
 - 2.- Cuerpo regenerativos.



ESCUELA DE QUIMICA
BIBLIOTECA

Endosporas: El primero que las observó y descubrió fue Schaudin en Bacillus bulschii.

Cuando una célula está próxima a esporular, el protoplasma que es homogéneo, empieza a formar gránulos, se cree que su condensación del protoplasma al ir perdiendo agua, se empieza a mover para reunirse en ciertas regiones y esta reunión puede ser en un polo formando una endospora polar; cuando la reunión se acerca dentro del centro y se le llama excéntrica y si forma en el centro es ecuatorial (la reunión es característica de especies).

La condensación del material es refringente; en la periferia de

La condensación, se va formando una capa y se llama Exosporium.

Así queda, es una espora dentro de las bacterias.

Las esporas pueden ser esféricas, elípticas, etc., el tamaño puede ser más grande o más chica que la propia célula.

Cuando la célula se forma elíptica al eje longitudinal o axis de la bacteria, puede o no ser paralela o formando un axis con el de la espora a que le dió origen. Esta característica y la forma de las esporas es carácter constante de las bacterias.

La liberación de endosporas ocurre por el rompimiento o desintegración de la pared celular, puede ocurrir en diferentes posiciones: Ecuatorial, polar, oblicua (es constante en cada especie).

En la bacteria después que se ha formado la endospora, la bacteria puede seguirse moviendo; quiere decir que no entra todo el protoplasma.

Las fantomas, son las estructuras que quedan cuando se ha liberado la endospora y el protoplasma que queda se condensa y puede llegar a teñirse levemente.

CARACTERISTICAS DE LAS ENDOSPORAS.

- 1.- Altamente refringente.
- 2.- Resistente a altas temperaturas.
- 3.- Resistente a la tinción.
- 4.- Resistentes a la disecación (y otros factores ambientales

externas). Las esporas pueden soportar temperaturas de ebullición a 100°C.

Las esporas pueden ser variables después de 20 años (endosporas), esto no es general.

A la regeneración de una célula a partir de una endospora, en condiciones ambientales favorables toma agua y se agranda, entonces la pared gruesa que la cubre empieza a disolverse o puede romperse el exosporium y sale el contenido de la endospora, aquí comienza a formarse la pared celular y forma la célula bacteriana.

El exosporium puede o no formar la pared celular. La endospora sólo da lugar a una célula bacteriana.

Ensayos de los métodos de inoculación con bacterias.- Tiene como objeto saber cual de los cuatro métodos es mejor para cada planta.

Los síntomas más marcados, más típicos y observables; será ese el mejor método:

- 1.- Aspersión foliar.
- 2.- Raspado de hoja (se usa carborundum).
- 3.- Por punsi3n o inyecci3n.
- 4.- Por punsi3n m3ltiple.

Estos son los cuatro métodos que se presentan con más frecuencia en la naturaleza.

Para preparar el inóculo se hace una suspensión de bacterias, que pasará en una asa, a un frasco con agua estéril.

Se hace la inoculación y se le da mucha humedad; que beneficia la bacteria.

Haya que poner etiqueta, nombre, género de bacteria inoculada, método de inoculación y fecha.

Para cada método usar su testigo poniendo agua estéril para prueba.

ARTROSPORAS.- Fueron observadas y descritas por De Bary en el año de 1844; se encuentran en forma de bacterias, bacilos, etc., y son esferoides y forman cadenas. Cuando se van a formar las Artrosporas se redondean, engruesan su membrana y la célula adquiere su forma de reposo.

Las Artrosporas son menos resistentes que la endosporas, a la temperatura de 80°C se desintegran, se colorean fácilmente y las sustancias químicas las atacan.

CLAMIDOSPORAS.- La diferencia con Artrosporas, es que aquí no hay formación de tabiques, hay engrosamiento de la membrana que la cubre.

Conidias.- Son cuerpos esféricos muy pequeños, por eso con poco conocidos.

Sin embargo en bacterias ferrosas, aquí las conidias sí son

visibles. Las conidias no se consideran células de reposo porque germinan dentro de las células en que se formaron y al germinar le dan mal formación a la célula madre y se liberan cuando la célula madre muere.

Al haber conidias en las células se les reporta como de involución.

Cuerpos regenerativos.- Son cuerpos esferoides más grandes que las conidias, poseen una pared fuerte y espesa y cuando se liberan de la célula se conservan como micrococos, después estos micrococos se dividen como una célula normal. Algunas veces estos cuerpos regenerativos son móviles; razón por la cual se consideran entre células normales y conidias.

Las bacterias fitopatogénicas no producen esporas, pero sobreviven en residuos de cosechas etc. por largo tiempo Pseudomonas lacrymans sobrevive hasta 20 meses en semilla de pepino. En el caso de Xanthomonas campestris, sobrevive por varios meses en semilla de calabaza y estos de cualquier planta en el suelo. Su mejor hospedera es la col.

Las bacterias que causan daños en las raíces, como soreptomycetes scabies, produce la rota de la papa, sobrevive en el suelo, sin la protección de ningún residuo vegetal.

REPRODUCCION SEXUAL

Este punto está obscuro, pues todavía hay dudas en esta reproducción: Aquellos que lo aseguran dicen que esto sucede al ponerse en contacto de dos bacterias y aquí hay intercambio de ácidos nucleicos, que poseen

los factores genéticos (materiales genéticos).

Lo tratan de demostrar con:

Scheruchia coli, bacterias de gram negativo y crece en medios de cultivo simples, a base de glucosa y sales minerales y tiene la característica de presentar muchos mutantes y éstos no pueden crecer en medio de cultivo de glucosa y sales minerales, a una de ellas se les debe adicionar biotina y metionina, no tiene la capacidad de sintetizarlo y pueden sintetizar teonina y leucina, el otro mutante tiene características contrarias.

Si estos dos mutantes se mezclan se ponen en una caja que tiene cultivo simple, se supone que no crecerían pero es al contrario, ésta colonia desarrolla sin agregar ningún aminoácido y nos da:

La gente que no está de acuerdo dice que se puede deber a sustancias de estímulo producidas por uno y otro mutante.

Para refutar lo contrario se pone el siguiente experimento:

En un tubo curvo con un filtro en medio y se pone un mutante en cada rama de este tubo, en el cual las sustancias se ponen en contacto pero no hay ningún crecimiento; el filtro no deja pasar las bacterias.

Para demostrar lo contrario se pone cultivo simple en el tubo curvo y se quita el filtro; aquí se lleva a cabo el crecimiento de la colonia de bacterias.

C R E C I M I E N T O

Cuando ocurre fusión binaria, se tienen dos células que crecen un poco y ya está adulta. Es el caso del crecimiento de la colonia (no de una célula).

El crecimiento de las bacterias, sigue un patrón más o menos fijo y el crecimiento de una colonia de una especie, en un momento determinado se puede graficar.

Existen 5 fases bien determinadas:

1. Fase Lag.- Se le nombra como fase inicial lenta o estacionaria; ya que de momento no hay crecimiento notorio.

En esta fase dan principio los procesos metabólicos que están relacionados con el desarrollo y el volumen de oxígeno respirado por unidad del volumen del protoplasma, éste se duplica según Buckman.

Henricc observó que antes de multiplicarse aumentan de volumen, lo observó en Escherichia coli, este aumento se debe a la actividad metabólica.

La fase Lag depende de varios factores:

a).- De que la fase del cultivo se tomó al inóculo que transferimos; cuando el inóculo es una fase que está de la fase estacionaria en adelante, la fase Lag será más larga; en cualquiera de las otras fases que se tome la fase lag es más corta.

b).- Del medio del cual se tomó el medio para transferir y del medio del cual transferimos, entre más apropiado sea este, más corta será la duración de la fase Lag. Por ejemplo: Una bacteria que se desarrolló mucho en hojas de calabaza, que si la ponemos en un medio menos apropiado, entonces durará más la fase Lag que si se le inoculara en hoja de calabaza.

c).- Clase o especie de organismo de que se trate (bacteria).

d).- Depende de la cantidad de inóculo que se transfiera a mayor cantidad de inóculo que transferimos; la duración de la fase lag es más corta.

II. Fase Log o de crecimiento logarítmico.- La duración de esta fase depende del organismo que se trate, Corinebacterium diphteriae crece más rápido que microbacterium tuberculosis.

2.- Depende de la temperatura; Hay límite y se dice que por cada 10°C se duplica la velocidad de crecimiento de la colonia (esto sucede dentro de las temperaturas cardinales de la especie).

3.- Depende de la penetración del organismo al medio o de la capacidad del organismo al medio que la rodea. La penetración está influenciada por los materiales de los que está constituido el medio.

Esta fase de crecimiento logarítmica sirve para ver el tiempo que dura una generación de bacterias a otro. Para elaborar esta gráfica partimos de la división binaria; así se demuestra:

No. de generación	No. de bacterias
0	1 - 2 ⁰
1	2 - 2 ¹
2	4 - 2 ²
3	8 - 2 ³
n	X - 2 ⁿ

$$G = \frac{t}{n}$$

G- Tiempo de una generación.

T- Tiempo total transcurrido.

N- Número de generación que se presenta.

En determinado momento el número de bacterias es: B_n y B₀ el número de bacterias que pusimos en la transferencia de donde se tiene que:

$$B_n = 2^n B_0$$

$$\log B_n = \log B_0 + n \log 2$$

$$\log B_n - \log B_0 = n \log 2$$

Se despeja a n

$$n = \frac{\log B_n - \log B_0}{\log 2}$$

$$G = \frac{t}{\frac{\log B_n - \log B_0}{\log 2}}$$

$$G = \frac{t \log 2}{\log B_n - \log B_0}$$

$$\log B_n - \log B_0$$

Para determinar B_n y B₀ por medio del conteo 1 cc al inocular y al momento que determinemos, esto es para cada caso.

III. Fase estacionaria o de equilibrio.- El medio ambiente es quien controla esta fase y la hacen variar todos los factores del medio ambiente, como son factores de crecimiento; al faltar uno de estos factores se suspende el crecimiento.

1.- La acumulación de sustancias tóxicas detienen esta fase, ácidos, alcoholes, etc., que son el resultado del metabolismo.

Se puso un Streptococcus faecalis es un caldo nutritivo, en uno de los casos se puso 0.1 de glucosa y en otro caso 1% de glucosa.

Horas	% de glucosa	pH	% de glucosa	pH
0	50,000	7.4	50,000	7.4
6	175'000,000	6.9	268'000,000	5.6
12	320'000,000	6.8	510'000,000	5.1
24	609'000,000	6.6	221'000,000	4.8

2.- Otro factor que actúa es la aglomeración, es decir la competencia por el espacio.

En esta fase las células no están en reposo sino que el número de células que nacen es el número que mueren.

3.- Otro factor es la especie de que se trate.

IV. Fase de muestreo logarítmica.- Hay una muerte logarítmica, esto se ha visto experimentalmente que así es, aunque no se sabe por qué factor.

Se ha determinado haciendo conteos cada determinado lapso.

V. Fase de sobrevivencia.- Después que la mayor parte de las células viables, que duran meses o años (sin ninguna actividad metabólica) y por diferentes cálculos y observaciones se ha llegado a la conclusión que por cada 10 millones que se encuentren en la fase de equilibrio; en esta fase vivirá una célula.

Preservación de cultivo.- La práctica o método para prolongar la fase estacionaria o de equilibrio; preparar medios de tal manera que no haya la producción de sustancias tóxicas; por ejemplo: en un medio agregar poca glucosa y sustancias que actúan como amortiguadoras de pH (sol. Buffer) como fosfatos:

$K_2 HPO_4$ y $KH_2 PO_4$. En cuanto al organismo, no podemos decir que dure mucho.

Los cultivos se deben poner en un refrigerador a una temperatura de 0-4°C.

AIREACION: El cultivo, se hace la inoculación en medio de cultivo, para que tenga mucho oxígeno. Una vez que la bacteria ocupa toda el área del medio se agrega aceite mineral estéril y se cubre el cultivo, elimina el oxígeno que está sobre la superficie.

HUMEDAD.- Una aplicación es el método llamado liofilización, que consiste en eliminar la humedad bajo condiciones frías.

Se tienen colonias en tubos, se cierra la boca del tubo y se colecta a una bomba de vacío y en esta forma se elimina el aire y la humedad y prácticamente se obtiene un polvo con bacterias viables, que se conservan por muchos años.

Otro método es el de preservación en dispersión coloide, no se sabe en qué se basa pero se ha comprobado que si las bacterias se dispersan en el material coloide y las bacterias inhiben su actividad metabólica.

Material coloide: Tierra de Buffer, suelo estéril pulverizado, arcilla coloidal; en estas condiciones son especialmente resistentes a la disecación.

FORMACION DE COLONIAS BACTERIANAS.

Colonia.- Es la progenia de una célula, la cual forma una masa aislada.

Cultivo.- Cuando nos referimos a la descendencia de varias células.

La naturaleza de las colonias está muy influenciada por las propiedades de los organismos que la compone; además depende del medio donde se desarrolló el individuo.

Las colonias bacterianas generalmente se desarrollan como masas compactas. Cuando se empieza a formar una colonia el crecimiento es logarítmico, pero ya que ocurre varias generaciones es muy complejo y debido a la proximidad de las células entre sí, ya que se establece

competencias por nutrientes y otros factores y hay sustancias que se acumulan por causa de metabolismo. Pueden presentarse competencia en colonias vecinas.

Las colonias que crecen en medios alcalinos tienen características constantes para cada especie diferente y al hacer la descripción de la especie bacteriana se incluye una caracterización de la colonia y el medio de que se trate, con propósitos de identificación se usan: color, forma, tamaño, consistencia de las colonias.

Por su forma las colonias bacterianas se dividen en puntiforme, Circular y Filamentosa.

Por su estructura externa (vista de arriba):

Irregular, Rizoide o rizoidal y agujada.

Por su elevación sobre la superficie del medio de cultivo:

Plana, elevada y convexa.

Umbinada.

Con respecto al límite de la colonia,

Entera.

Ondulada

Lobada o lobulada

Dentado



SECRETARIA DE AGRICULTURA
BIBLIOTECA

Filamentosa

Rizada

Ciliada

ESCUELA DE AGRICULTURA
BIBLIOTECA

Por su estructura interna (vista de arriba).

Homogénea

Granulada

Filamente granulada

Concéntrica

Por su consistencia.- Está muy gobernada por la especie de que se trate y el comportamiento de su crecimiento. Una especie que produce cápsula, la colonia toma una consistencia mucóide. En el caso de una célula que se divide y quedan unidas, da por consecuencia una colonia filamentosa.

APARIENCIA.- Podemos distinguir colonias coloreadas, opacas (opalescentes), brillantes, dispersas, etc.

COLONIAS LISAS Y RUGOSAS.- Cuando un cultivo bacteriano bajo condiciones diferentes producen dos o más tipos de colonias, por ejemplo: levantada, con bordes lisos, de consistencia homogénea, a éste tipo se le llama liso S (Smith), colonia de tipo rugoso presenta bordes dentados la superficie es rugosa y de consistencia granular.

CARACTERISTICA DE LAS COLONIAS LISA.

- 1.- Márgenes redondeados y lisos, superficie lisa, convexa y brillante.
- 2.- Las células bacterianas tienen una morfología normal y tienden a presentarse solas.
- 3.- Cultivada la colonia en caldo nutritivo, ésta se presenta uniformemente turbio.
- 4.- Las especies flageladas frecuentemente móviles.
- 5.- Buenos agentes inmunizantes, con antígenos presentes.
- 6.- Las especies capsuladas la presentan.
- 7.- Especies patogénicas generalmente virulentasss.
- 8.- La colonia se presenta en casos de enfermedad activa.
- 9.- Son químicamente activas.
- 10.- Sensibles a los bacteriófagos.
- 11.- Células resistentes a la fagocitosis.

R U G O S A

- 1.- Márgenes irregulares, superficie plana, rugosa y granulada.
- 2.- Las células tienden a presentar formas de involuciones (anormalidades temporales) y tiende a la biscoicidad.
- 3.- El caldo se observa claro y con sedimento granular.
- 4.- Tienen muy poca movilidad.
- 5.- Agentes pobremente inmunizantes, carencia de antígenos.
- 6.- Las especies capsuladas no presentan cápsula.
- 7.- La virulencia es reducida o ausente.
- 8.- Se presenta en condiciones de convalescencia.

- 9.- Actividad química reducida.
- 10.- Pocas sensibles a los bacteriófagos.
- 11.- Muy sensibles a la fagocitosis.

El cambio de colonia de lisa a rugosa se presenta con mayor frecuencia que rugosa o lisa.

La colonia lisa se le considera como normal en la especie.

Si es lisa o rugosa está en relación con la virulencia, actividad bioquímica y la actividad antigénica.

MÉTODOS DE TINCIÓN.- Procedimientos generales; la tinción de las bacterias en general depende de las mismas propiedades de los colorantes, como sucede en la tinción de tejidos animales y plantas, para propósitos histológicos.- Todos los colorantes bacterianos son productos sintéticos, anilinas y alquitranes de hulla.

Aunque los colorantes sintéticos varían mucho en su composición química y propiedades de coloración, para propósitos prácticos se dividen en:

Colorantes ACIDOS y colorantes BASICOS lo que no significa que los colorantes en si ácidos o bases libres, sino que los colorantes ácidos, deben su acción a un anión y las básicas a un catión y su reacción en su acción pueden ser ácidas o básicas.

Los colorantes básicos tienen mayor afinidad para los núcleos celulares, debido probablemente a la naturaleza de ácidos del material nuclear, mientras que los colorantes ácidos tienen una mayor tendencia a combinarse con el citoplasma. Las bacterias no muestran una estructura

típica celular y tienden a tefirse casi uniformemente con los colorantes nucleares, como lo son los colorantes básicos.

PREPARACION DE FROTIS.- Ordinariamente en los cultivos bacterianos puros pueden prepararse para su tinción haciendo frotis fijados de una manera simple en la flama de un mechero, debido a que la mayor parte de las bacterias por su tamaño pequeño y cierta rigidez de sus paredes, pueden secarse sin distorsionarse, aunque para estudios citológicos y determinaciones exactas de forma y tamaño, tengan que hacerse otro tipo de fijaciones.

FORMULA DE COLORANTES.- Existen muchas fórmulas para un mismo colorante, debido a errores que se han ido acumulando al transcribir los diferentes actores, a que muchas personas han hecho algunas modificaciones a las formas originales. Sin embargo las fórmulas que se han adaptado a la forma siguiente:

1.- CARBAL FUCSINA DE SIEHL.

- | | | | |
|----|-------------|-----------------------------------|--------|
| a) | Solución A: | Fucsina básica (90% pureza) | 0.3gr. |
| b) | Solución B: | Fenol | 5 gr. |
| | Agua | destilada..... | 95 ml. |

Después se mezclan las dos soluciones.

2.- CRISTAL VIOLETA. OXALATO DE AMONIO DE HUCKER.

- | | | | |
|----|-------------|------------------------------------|--------|
| a) | Solución A: | Cristal violeta (90% pureza) | 2gr. |
| | | Alcohol etílico (95% pureza) | 20ml. |
| b) | Solución B: | Oxalato de amonio | 0.8 gr |

Agua destilada 80ml.

Después se mezclan las dos soluciones.

3.- CRISTAL VIOLETA EN SOL. ALCOHOLICA.

Cristal violeta (90%) 2gr.

Alcohol etílico (95%) 20ml.

Agua destilada 80ml.

4.- AZUL DE METILENO ALCALINO DE LAEFFER.

a) Solución A: Azul de metileno 90% 0.4gr.

Alcohol etílico 95% 30 ml.

b) Solución B: Hidróxido de potasio 1 gr.

Agua destilada 1000 ml.

De la solución B se toman 100 ml. y se mezcla con la solución A.

5.- AZUL DE METILENO DILUIDA EN ALCOHOL

Azul de metileno 80% 0.3gr.

Alcohol etílico 95% 30 ml.

Agua destilada 100 ml.

6.- CARBAL-ROSA DE BENGALA.

Rosa de bengala 90% 1gr.

Fenol (so. acuosa 5% 100ml.

Cloruro de calcio 0.01-0.03gr.

La cantidad de cloruro de calcio determina la intensidad de coloración.

Los colorantes deben dejarse actuar entre 5 y 60'' por aplicación, raras veces ocurrirá sobre decoloración, excepto con la carbal fucsina, lo cual no debe temerse ya que es fácil de decolorarse.

Los resultados dependerán del colorante que se escoja, los que hemos anotado están en orden de intensidad de acción, así la cabal fucsina de coloración intensa y no se aconseja cuando se desee coloración selectiva.

El cristal violeta es muy útil en trabajos de rutina. La soluciónes de azul de metileno son mucho más selectivas con especial afinidad por los granos metacromáticos. El rosa de bengala es útil cuando hay presencia de material coloidal orgánico o mucosidad ya que estos materiales son difíciles de colorear.

(Colorantes bacterianos de uso general para procedimientos alternados).

7.- CARBOL FUCSINA DE KINGAUN.

Fucsina básica 90%	4 gr.
Fenol (cristales)	8 gr.
Alcohol etílico 95%	20 ml.
Agua destilada	100 ml.

8.- CARBOL CRISTAL VIOLETA DE NICOLLE.

Solución A: Cristal violeta 90%	0.4 gr.
Alcohol etílico 95%	10 ml.
Solución B: Fenol	1 gr.

Agua destilada100 ml.

Después se mezclan estas dos soluciones.. Muchas veces esta fórmula (8) se prefiere como uso general y para la técnica de Graham, si se prepara adecuadamente es permanente, pero tiene la tendencia a coagularse si la cantidad de colorante es muy grande por eso se ha disminuido a 0.4 gr. sin embargo no parece tener ventaja sobre cristal violeta más oxalato de amonio (2).

9.- ANILINA - VIOLETA DE GENCIAMADE ERHLICH.

Solución A: Cristal violeta 90%1.2 gr.

Alcohol etílico 95%12 ml.

Solución B: Anilina12 gr.

Agua destilada98 ml.

Esta solución B deberá dejarse acentar por unos minutos y filtrar, después mezclarse las dos soluciones.

Tinción negativa.- Procedimiento recomendable.

10.- Solución de nigrosina de Dorner.

Nigrosina soluble en agua, 10 gr. Agua destilada, 100 ml.; sumérgase a baño María por 30 minutos, después agréguese formalina 0.5 ml.

Esta solución se usa para la demostración negativa de las bacterias en lugar de la tinta china. Mezcle lo que se tome con la asa de transferencia de la suspensión bacterias con una cantidad igual de colorante, deje secar al aire y observe bajo el microscopio. Resultado: Si se

obtiene células sin colorearse en un fondo oscuro uniforme la preparación está bien hecha.

11.- Rojo congo de Henian.

Congo rojo 80% 2 gr.

Agua destilada 100 ml.

Ponga una gota de colorante en un porta-objeto, mezcle el cultivo bacteriano y extiéndalo hasta obtener una capa delgada; después de que la capa se haya secado lave con ácido clorhídrico al 1% y seque al aire o con papel secante.

Resultados: Células no coloreadas en fondo azul; no se obtienen buenos resultados en cultivos de caldo (Líquidos) o en soluciones salinas sino se ha centrifugado.

COLORACION DE GRAHAM

Hay numerosas modificaciones al método de coloración de graham.

Las modificaciones de Hucker para colorear frotis de cultivos puros y la de Kopeloff y Beerman para preparación de secreciones o de cultivos puros de organismos que producen grandes cantidades de ácidos.

Modificaciones de Hueker.- Que no es la modificación que hizo graham el método llamado lugol.

Iodo 1 gr.

Ioduro de potasio 2 gr.
 Agua destilada 300 ml.

La solución que se usa para contraste es: Safranina (sol. al 2.5% en alcohol al 95%) 10 ml.

PROCEDIMIENTO: Se tiñe el frotis con cristal violeta, exalato de amonio por 1 minuto; algunas veces se ha encontrado que ésta fórmula da una tinción muy intensa y que ciertos organismos graham negativo Gonococcus, no se decoloran apropiadamente, esto se puede evitar usando menos cristal violeta.

Lave con agua de la llave por unos 2 segundos, sumerja un minuto en solución de iodo, lave con agua de la llave y seque con papel secante, decolore durante 30 segundos con alcohol etílico al 95% y agitando suavemente, seque con papel secante. Deje el contraste durante 10 segundos en la solución de safranina y lave en agua de la llave, seque con papel secante y examine.

Resultado: Los organismos graham positivo se tiñen de color azul y los negativos de rojo.

Otra modificación para la decoloración del graham es la modificación Burke y Kopeloff-Becrman.

Se trabaja con violeta de genciana alcalino.

Solución A: Genciana o cristal violeta 1 gr.
 Agua destilada 100 ml.

Solución B: Carbonato ácido sodio 1 gr.
 Agua destilada 20 ml.

Se usa la solución ionada de Burke.

Iodo 1 gr.
 Ioduro de potasio 2 gr.
 Agua destilada 100 ml.

Hay otra solución ionada de Kopeleff y Beerman.

Iodo 2 gr.
 Hidróxido de sodio (normal) 10 ml.

Para hacer una solución normal de NaOH, se necesita 40.01 gr.
 de NaOH gr/l.

Después que se disuelve el iodo se afora hasta 1 litro.

Para contraste llamado de Burkey es:

Safranina 85% 2 gr.
 Agua destilada 100 ml.

Hay otra solución de contraste:

Fucsina básica 90% 0.1 gr.
 Agua destilada 100 ml.

SECUENCIA DEL TEÑIDO

I. Prepare el frotis y seque al aire sin calor tratando de tener

una capa lo más delgada posible.

- II. Inundar la preparación con la solución A, luego mezcle 2-3 gotas de la solución B (NaHCO_3), se dejan actuar durante 2-3 minutos, también se pueden mezclar las soluciones A y B antes de aplicarse 1.5 de (sol. A) y 0.4 ml. de (sol. B) y se dejan actuar durante 5 minutos, luego se lava con cualquiera de las soluciones ionadas antes citadas, luego del lavado se le pone unas gotas de solución ionada y se deja en reposo; luego se lava en el chorro de la llave y se sacude el agua que tiene la preparación y se seca con 1 eter mezclado con acetona (sol. 1 eter por 3 de acetona), se continúa agregando hasta que no se colorea la gota y se deja secar al aire y una vez seca, se le pone cualquiera de las soluciones para contraste y dejan de 5 a 10 segundos; después se lava en la llave y queda listo para observar.

Resultados: Los organismos graham positivo se tificarán de azul y los graham negativo de rojo.

Interpretación de la coloración de graham: Es necesario ser cauto en la interpretación en la coloración de graham, pues a menudo la prueba es defectuosa ya que los organismos generalmente se describen, como Graham positivo o Graham negativo, muchos organismos son Graham variable positivo negativo, por lo que no se debe dar el resultado de la reacción Graham de un organismo en base a una sola prueba, debe repetirse el procedimiento en cultivos de diferente edad, usando más de una técnica de tinción de Graham, para poder determinar la constancia del organismo hacia los colorantes.

Hay dos fenómenos que merecen consideración:

- I. Henry y Stacey, Bartolomeo y Umbreit han demostrado que los organismos Graham positivo pueden ser Graham negativo mediante tratamientos de rubonucleosa y que puede restaurarse su reacción Graham positivo con un tratamiento subsecuente de ribonucleato de magnesio.

- II. Algunos organismos tienen gránulos que resisten a la decoloración y que pueden llegar a interpretaciones equívocas. Tales observaciones demuestran que la tinción de Graham no siempre dá una reacción perfectamente bien definida y clara, por lo que los resultados deben interpretarse cuidadosamente.

Método de tinción ácido rápido.

METODO DE ZUHL - NEELSEN.

Tiñe las preparaciones ya secas durante 2 o 3 min., con carbón fucsina de ziehl y aplicando calor para provocar evaporación lenta, ya seca se lava con agua de la llave, enseguida se decolora con alcohol etílico al 95% que contenga 3% de HCl concentrado, hasta que sólo quede una ligera coloración rojiza, enseguida se lava con agua de llave y se pone una solución de contraste azul de metileno fórmula 4, 5 y después se lava con agua de la llave, se seca y se examina.

Resultados: Por esa técnica se dividen en ácidos rápidos y los que no lo son, los primeros se tiñen de rojo y los segundos se tiñen de azul.

TINCION DE ESPORAS

Método de Dorner.

Procedimiento: En un tub de ensayo con 3 a 5 gotas de agua, haga una suspensión abundante de organismos, agregue igual cantidad de carbol-fucsina de ziehl, recién filtrada, déjese la suspensión en baño María de 10 a 15 min.

En un porta-objeto mezcle la cantidad que tome con una asa, de transferencia de la preparación coloreada con una cantidad igual de solución de nigresina de Dorner. Extienda tan delgado como sea posible y deje secar. Los resultados deben ser los siguientes: Esporas color rojo, células vegetativas sin colorearse en un fondo gris.

MModificaciones de Snyder al método Dorner: Haga una preparación en seco y cúbralo con papel secante, sature el papel secante con carbol fucsina de Ziehl recién filtrada, deje que se evapore por 5 a 10 min., manteniendo húmedo el papel agregando gotas de colorante. Decolore con alcohol etílico al 95% (en casos de organismos que no retengan bien el color, la decoloración se omite), lavar con agua de la llave y después aplicar una gora de solución acuosa saturada de nigrosina o líquido de Dorner y desparramar la preparación.

Secar calentando ligeramente, sin haber lavado antes. Los resultados en este caso son iguales al anterior, pero este método más efectivo, por lo que se aplica a las bacterias que son difíciles de teñir por el método de Dorner, en el caso de *Bacillus subtilis*.

TINSION DE FLAGELOS.

La tinción de los flagelos es difícil y se han propuesto numerosos métodos: Se ha reconocido que los flagelos bacterianos están por debajo del límite visual en tamaño, pero recientemente, con el aparato electrónico se ha tenido una idea definida de qué tan pequeñas son, de 0.02-0.03 micras. Las microfotografías con microscopio electrónico, a menudo muestran más flagelos que los que se ven en las preparaciones teñidas. Para la tinción de flagelos se tiene que recurrir a la técnica de Loeffler que consiste en utilizar un mordente antes de teñir con el fin de aumentar el tamaño aparente de los flagelos. Otra dificultad de la tinción de flagelos, es la facilidad con que las bacterias se desprenden de ellas, cuando no se hace un manejo adecuado de los cultivos; para prevenir esto, se emplean porta objetos limpiados en forma especial y ciertos cuidados en la preparación del frotis.

METODOS DE PREPARAR LOS PORTA-OBJETOS.

Ordinariamente la limpieza con papel para lentes noera suficiente para este propósito; se han propuesto varios métodos pero las siguientes indicaciones dan buenos resultados.

Usar porta-objetos nuevos y de preferencia que sean Pyrex o que resistan el calor, limpiar con bicromato, luego lavarlos con agua destilada estéril, con alcohol al 95% y luego limpiarlos con un pedazo de tela; después se flamean por un lado y otro varias veces, hasta que la flama dé una ligera coloración naranja.

Métodos de manejo de los cultivos.

Ninguno de los métodos propuestos se puede recomendar como el mejor, sin embargo a mí me parece satisfactorio el siguiente:

Usar cultivos jóvenes de 12 a 20 horas después de haber sido transferidos; antes de proceder hay que verificar la movilidad y esto se hace preparando una suspensión en agua, del cultivo y agitar éste, se pasa a una suspensión en agua, del cultivo y agitar, éste se pasa a un tubo estéril y se encuban de 10 a 30 minutos, en este momento se observan una gota al microscopio; si son móviles se toma una pequeña cantidad de la superficie, con una pequeña pipeta (capilar), en un sólo porta-objetos se ponen varias gotas y se deja secar el agua.

PROCEDIMIENTO DE TINCION

Método de Cázares Gil; la fórmula es:

Acido tánico	10 gr.
Cloruro de aluminio hidratado	18 gr.
Cloruro de Zinc	10 gr.
Fucsina básica	1.5 "
Alcohol 60%	40 ml.

Los sólidos se disuelven en alcohol por trituración en un mortero; en 10 ml. de alcohol, después se le pone el resto, esta solución alcohólica puede guardarse por años y para usarse debe mezclarse con igual cantidad de agua y filtrarse en las preparaciones.

Procedimiento de tinción: Se prepara el frotis y ponemos el mordente, se deja actuar por 60 segundos sin dejarse calentar, enseguida se lava con agua de la llave; después inundar la preparación con carbol fucsina de ziehl recién filtrada, se deja secar y se examina.

Resultado.- Los flagelos bien teñidos son de color rojo. Existen otros métodos como el de Gray Lacilfson, Bailey.

Tinción de cápsulas: Las cápsulas bacterianas son las estructuras que más fácilmente se pueden confundir con impurezas, debido a que muchas veces se muestran como áreas no coloreadas, razón por la que, la mejor manera de demostrar su presencia es por medio de tinción selectiva.

Métodos de Leipson, Hims, Antony, etc.

Métodos de Antony y modificación de Tyler.

Cristal violeta 85% 0.1 gr.

Agua destilada 100 ml.

La modificación de Tyler consiste en agregar ácido acético glacial 0.25 ml.

Procedimiento: Preparar un frotis y secar al aire, teñir durante 2 minutos con la solución acuosa de cristal violeta o de 4 a 7 minutos usando la modificación de Tyler. Después hay que lavar con solución acuosa de sulfato de cobre $(\text{CuSO}_4) \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, se deja secar al aire y se examina.

Resultados.- Las cápsulas de un color violeta y la célula se verá

de un color azul oscuro.

RESPIRACION DE BACTERIAS

Definición de respiración: Es la oxidación o excisión o descoblamiento de los compuestos orgánicos complejos (glúcidos o azúcares) a compuestos más simples ejem. CO_2 más H_2O .

Una forma muy general de representar la respiración es la siguiente:

Hay desprendimiento de calor. Todos los procesos de los organismos de síntesis, crecimiento, etc. requieren de energía, la cual obtienen mediante la respiración.

En todos los procesos de respiración hay un oxidante que provee de oxígeno a cambio de un reductor que provee de hidrógeno.

Clasificación de los organismos según su respiración.

Una clasificación general se basa en la necesidad que tienen los organismos para crecer en ausencia o presencia de oxígeno atmosférico.

Organismos aerobios obligados, anaerobios facultativos, aerobios facultativos y anaerobios obligados.

Medios micro-aerófilos: Cuando no crecen los organismos por falta de oxígeno o por tener en la atmósfera puro oxígeno.

AEROBIOS OLIGADOS.- Son los microorganismos que sólo pueden vivir en presencia de oxígeno libre o atmosférico; por ejemplo la mayor parte de las bacterias fitopatógenas.

ANAEROBIOS FACULTATIVOS.- Son organismos fundamentalmente aerobios; pero bajo ciertas condiciones pueden vivir en ausencia de oxígeno libre, ejemplo: Echerichia Coli.

AEROBIO FACULTATIVO.- Organismos que fundamentalmente son aeróbios bajo ciertas condiciones de temperatura y pueden vivir en presencia de oxígeno libre.

ANAEROBIOS OBLIGADOS.- Aquéllos que sólo pueden vivir en ausencia de oxígeno libre, ejemplo: Los tridium tetani.

a.- Medio micro-aerófilos.

B.- Aerobio obligado.

C.- Anaerobio facultativo.

K.- Aerobio facultativo.

L.- Anaerobio obligado.

M.- Medio micro-aerofilo.



INSTITUTO VETERINARIO
 DE LA UNAM

NUTRICION

No todos los organismos son semejantes en cuanto a los requerimientos nutricionales y esto es debido a las diferentes habilidades para sintetizar los alimentos; se puede generalizar que, entre más evolucionado es el organismo su capacidad sintética es menor y el número de elementos que necesita es mayor.

Muy pocas bacterias son fotosintéticas, que pueden obtener su energía a partir de la luz, pero la mayoría tiene esa energía de su alimento; los alimentos tienen dos fines:

Uno de ellos, es para elaborar sus materiales constituyentes (núcleo, membrana, etc.) y la otra función, se usa como fuente de energía. La mayor parte de las bacterias necesita de los siguientes elementos inorgánicos: Carbono, Nitrógeno, hidrógeno, fósforo, oxígeno y azufre; en menores cantidades se requiere fierro, calcio, magnesio, potasio, sodio, cloro y otros en muy pequeñas cantidades: Zinc, cobre, boro, molibdeno, iodo y estroncio.

Basándose en las fuentes de energía de los microorganismos se clasifican en:

FOTOSINTETICOS.- Obtienen energía a partir de la luz, aprovechando el carbono a partir del CO_2 y algunos minerales.

CO_2 Minerales luz energía.

Para utilizar la luz son necesarios los cloroplastos, que tienen pigmentos parecidos a la clorofila.

AUTOTROFICOS.- Derivan la energía de la oxidación de diferentes materiales inorgánicos y éstos pueden ser Cu, S, NH₃ etc, también obtienen su carbón a partir del CO₂, pero en ocasiones lo tienen a partir de materiales orgánicos.

HETEROTROFICOS.- Dentro de este grupo está la mayoría de las bacterias y aquí obtienen su energía a partir del carbón de materiales orgánicos, aunque algunos de ellos lo pueden obtener del CO₂.

Saprófitos.

Heterotróficos

Parásitos.

Saprófitos.- Aquellos organismos que pueden vivir en materiales orgánicos muertos.

Parásitos.- Viven en organismos vivos.

Los parásitos pueden crecer aunque no sea tejido vivo, el medio donde se puede hacer crecer a las bacterias en caldo nutritivo, que es extracto de carne más peptona.

Caldo nutritivo.

Peptona o triptona	5 gr.
Caldo o extracto de levadura	5 gr.
Glucosa	1 gr.

K_2HPO_4 5 gr.

Este último actúa como amortiguador del pH.

Todo en un litro de agua.

ENZIMAS

En el metabolismo, hay reacciones químicas en los organismos, las cuales necesitan ser contrarrestadas.

Enzima.- Catalizador orgánico formado por células vivas.

En el metabolismo, esto se lleva a cabo para varios fines: Elaboración de materiales y energía (utilización de nutrientes) el metabolismo sirve de reacciones químicas y las enzimas se dividen en: Las que actúan fuera de la célula bacteriana que simplifica sustancias de peso molecular elevado, que las desdobla en materiales que les sirven como nutrientes, otras enzimas ayudan a transformar los nutrientes que se han absorbido y ésta transformación a materiales utilizados a reacciones de óxido-reducción. Estas son las que liberan o absorben energía.

Las enzimas que actúan fuera se les llama enzimas hidrolíticas, extra-celulares o exoenzimas; las que actúan dentro de las bacterias se llaman enzimas intracelulares o endoenzimas.

Por lo que respecta a la naturaleza de las enzimas, enzimas solubles se les puede separar del cuerpo de la bacteria; hay otras enzimas que no se pueden separar por centrifugación, no se pueden purificar y se les llama enzimas particulares.

Siempre en las bacterias hay enzimas que son constituyentes de las bacterias y se les llama enzimas constitutivas, en cambio hay otras que sólo se producen en presencia de ciertos extractos, por reacción del medio que son las enzimas inducibles y al sustrato se le llama medio inductor.

REACCIONES DE LAS BACTERIAS.

1.- Bacteriófagos.

2.- Antibiosis.

Los bacteriófagos, son virus que viven o se alimentan de las bacterias, éstos bacteriófagos se han estudiado en *P. coli* y se han estudiado 7 bacteriófagos diferentes. La mayor parte de los bacteriófagos tienen una cabeza exagonal (prismática) y además una cola, por la cual se adhiere a la bacteria de la cual se alimenta. Los bact. tienen ácido desoxirribonucléico (ADN) un 40% y la cubierta es proteína, la fusión de ADN para reproducirse y la proteína como protectora para adherirse a la célula. El efecto que causa en las bacterias es un efecto de lisis (destrucción) en las bacterias ocurren varias fases en el desarrollo del fago; primero la infección, luego la multiplicación del virus y la lisis, la liberación.

Bacteriófago.- Que come bacterias.

La medida del objeto es de 2 ml. es decir, dos mil micras; cada pequeña división vale 10 m. al hacer coincidir a líneas y ver otras 2 líneas tenemos:

Objetivo	Ocular
32	20
320	20
X	1

X cada división vale 16M del ocular.

Para el objetivo de 430X

Objetivo	Ocular
3	8
X	1

X $3 \frac{3}{4}$ de M por cada división del ocular

(430X)

El ciclo empieza cuando el fago penetra en la célula bacteriana, penetra el ácido desoxiribonucleico y la cápsula formada por proteínas queda afuera.

Luego viene la reproducción de los fagos, después de una serie de cuerpos de 100 a 200, le sigue la fase donde se recubren de su capa protéica. A la parte sin cubierta se le llama fago vegetativo.

INFECCION LISOGENICA.

Entra el virus pero no se empieza a reproducir inmediatamente, se adhiere al núcleo y se va con los cromosomas; a éstas bacterias se les llama lisogénicas y en un momento determinado se empieza a reproducir el virus.

Fago temperate.- Bacterias que tienen combinadas las dos características antes vistas; o sea, la infección lítica y lisogénica, se han hecho algunos estudios y se ha llegado a la conclusión que el ADN, están compuestos siempre en una forma ordenada, que les da ciertas características al virus, para que se comporte como lítico y lisogénico, en la descendencia de la bacteria los fagos que se encuentran en una combinación de los dos tipos.

Los cristales virosos.- Se obtienen por su centrifugación y se usa como ióculo.

RELACIONES ENTRE MICROORGANISMOS

Las relaciones entre micro-organismos se dividen en:

- 1.- Relaciones simbióticas, y
- 2.- Relaciones ecológicas.

Simbiosis.- Es una asociación más o menos estrecha en la vida de organismos, sin entrar en una asociación íntima.

En *pseudomonas solanacearum*, causa una marchites debido a la obstrucción de vasos, es causada por la acción de unas enzimas que secreta la bacteria; pectinasa y celulosa.

Los puntos de vista de Gauman para explicar la potogenisidad y dice que para que un organismo sea patógeno debe tener las siguientes características:

- 1.- Debe tener compatibilidad con el hospedera y a esta característica se llama afinidad.
- 2.- Debe tener la capacidad para invadir a la planta o sea, entrar habilitar y vencer la resistencia que opone la llama "agresividad".
- 3.- Habilidad para provocar la enfermedad y se le llama patogenicidad.

RELACIONES ECOLOGICAS.

- a) Relación ecológica neutral.- Es la relación que normalmente sucede en la naturaleza.
- b) Relación ecológica simergista.- Es cuando uno de los organismos ayude al otro para su supervivencia.

Dos organismos; mucor y pirimidina.

Simergismo.- La acción combinada de 2 o más sustancias, para producir un efecto, que la suma de las dos tomada independientemente.

Relación ecológica metabiótica.- Es una relación donde los organismos preparan un ambiente favorable para sus sucesores. Por ejemplo, en papa, cuando hay un ataque de *Erwinia carotovora*, ya puede atacar como invasión secundaria el *Bacillus mesentericum*, sólo ataca cuando ha atacado la primavera.

Relación ecológica antagónica.- Es cuando uno de los micro-organismos actúa sobre el otro en una acción desventajosa. Por ejemplo *Pseudomonas fluorescens* y *Ustilago maidis*, ambas atacan al maíz pero cuando el primero ataca, el segundo no puede atacar.

Una subdivisión: Es antibiosis.

Antibiosis: relación antagónica.

ANTIBIOTICOS.- Es el estudio comenzado con las observaciones de Pasteur en 1877, trabajó con *Bacillus anthracis*, empezó a observar que había ciertas bacterias que inhibían el crecimiento de *Bacillus anthracis*. Posteriormente en 1924, Fleming, trabajaba *Staphylococcus* y se dió cuenta que un hongo era capaz de inhibir el crecimiento a ciertas distancias, este hongo fue *Penicillium notatum*, después se logra aislar la sustancia que inhibía el crecimiento y se le dió el nombre de penicilina.

En 1936 se aisló otro antibiótico y se purificó, fue la gliotoxina, del género de hongos *Gliocadium*. Waksman.- considerado padre de la Microbiología del suelo, emprendió un estudio de la familia Streptomycetina, Streptomycina, streptotricina. Dentro de los antibióticos el que se puede obtener por medio sintético es la cloromicetina y se descubrió a partir de *Streptomyces*, Venezuela.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La agricultura en México se ve grandemente afectada por una gran diversidad de enfermedades, las cuales son causadas por hongos, bacterias, virus, etc. Para poder realizar un diagnóstico acertado acerca de lo que está perjudicando a nuestros cultivos es necesario en ocasiones, acudir al laboratorio, aya que en este existe una gran cantidad de materiales, los cuales proporcionan ayuda para realizar un estudio acertado sobre lo que tanto daño causa a la agricultura y de ahí poder determinar qué ayuda a resolver el problema.

Para el estudio en el laboratorio es necesario usar utensilios que nos ayudan a detectar de la sintomatología de la planta afectada qué agente es el causal de la enfermedad con éxito, mediante el empleo adecuado de los mismos.

Los medios de lucha contra las enfermedades bacterianas de las plantas son muy reducidos. En algunos casos el empleo de variedades resistentes o poco sensibles permiten resolver el problema. Cuando la enfermedad se transmite por las semillas, la desinfección de éstas por medio de agua caliente constituye una medida útil. Los tratamientos con productos químicos a base de cobre en ocasiones tienen cierta eficacia. Algunos antibióticos como la estreptomycinina permiten luchar contra bacterias vegetales.

RESUMEN

Las bacterias son plantas microscópicas generalmente unicelulares (hay algunas multicelulares) muy poco evolucionadas de la clase de Schizomycetas. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y presentan formas tales como de varillas, esféricas, en espirales o filamentosas.

Se conocen aproximadamente 1600 especies de bacterias. La mayoría de ellas son saprófitos obligados y como tales benefician al hombre porque le ayudan descomponiendo grandes cantidades de M.O. producidas anualmente por el hombre y su industria como productos de desechos o como resultado de la muerte de plantas y animales. Algunas especies causan enfermedades al hombre incluyendo la tuberculosis, pneumonía y fiebre tifoidea; también causa enfermedades de animales como brucelosis y antrax. Cerca de 180 especies han sido reconocidas como fitopatógenas. Todas las bacterias patógenas son saprófitas y por lo tanto pueden cultivarse artificialmente.

Algunas bacterias pueden moverse en medios líquidos mediante sus flagelos; mientras que otras no presentan tal característica. Algunas pueden transformarse en esporas aún cuando las fitopatógenas no, sin embargo algunas filamentosas pueden producir esporas llamadas conidios en la punta del filamento. Las bacterias se reproducen con una rapidez asombrosa y de aquí deriva una gran importancia como patógenos. Todas las bacterias fitopatógenas son aerobias aún cuando hay algunas anaerobias facultativas. Facultad que ejercen dentro del tejido vegetal en donde en ocasiones no encuentran aire suficiente.

El primer investigador que consiguió una bacteria como fitopatógena fue Burril, quien entre 1878 y 1884 estudió el Tizón de Fuego del peral.

En 1883 Wakker publicó sus trabajos acerca de una enfermedad del jacinto, la cual comprobó que era producida por una bacteria. Posteriormente Arthur (New York) confirmó mediante los postulados de Koch el trabajo inicial de Burril. Algunos años más tarde Savastano (Portugal) y E. Smith (E.U.A.) añadieron algunos casos a la lista de bacterias fitopatógenas con lo cual se reafirmó su importancia.

Un gran número de bacterias fitopatógenas se encuentran ampliamente distribuidas mientras que otras se limitan a ciertas áreas donde se cultivan los hospedantes específicos; bajo condiciones favorables de humedad y temperatura pueden llegar a producir epifitias devastadoras. El ataque bacteriano puede comprender síntomas tales como nutrientes suaves, manchas foliares, amarillamiento, tizones, enfermedades vasculares y agallas. Cualquier tipo de síntomas puede ser causado por varios patógenos bacterianos de diferentes géneros y cada género contiene algunas patógenas capaces de producir diferentes tipos de enfermedades. Las especies de *Agrobacterium* sólo pueden producir desarrollos excesivos aún cuando éstos pueden ser también ocasionados por especies de *Corynebacterium*, *Pseudomonas* y *Xanthomas*.

Aislamiento.

Ya que las bacterias producen gran cantidad de unidades reproductivas, se aislan más fácilmente mediante diluciones.

Para evitar la contaminación de un cultivo, las partes vegetales enfermas se desinfectan superficialmente con una solución débil de hipoclorito de sodio.

clorito (1%) de sodio, con lavado en agua estéril o se sumergen en etanol al 60% seguido por un paso a la flama y se puede proceder en diversas formas:

a) Algunas veces se introduce una aguja estéril en el tejido desinfectado, se saca y con ella se raya la superficie del agar.

b) También se puede usar un bisturí estéril y unas pinzas con las cuales se puede obtener una porción del tejido enfermo, la cual se coloca sobre el agar. Con la parte de la porción del tejido enfermo que presenta la superficie cortada, se raya la superficie del agar.

c) Una de las técnicas más empleadas para el aislamiento de bacterias especialmente tratándose de patógenos que causan manchas foliares es la siguiente:

1. Desinfección en NaOCl al 1% o etanol al 70% y lavado en tres cambios de agua estéril.
2. Coloque trocitos de tejido enfermo en 0.5 a 1.0 ml. de agua estéril en una caja de petri y haga cortes finos con una navaja u hoja de afeitar flameada y espere varios minutos.
3. Transfiera con el asa varios de la suspensión a otra caja que contiene 0.5 a 1.0 ml. de agua estéril, mezcle y repita esto una, dos o tres veces.
4. Añada a las tres o cuatro cajas, agar-carne-peptona u otro medio adecuado el cual debe tener una temperatura de 45 a 50°C y mezcle cuidadosamente por rotación. Espere a que el agar solidifique e invierta las cajas para evitar que las colonias bacterianas se unan.

Las cajas de cultivo se incuban de 24 a 48 horas a 28°C. Si el examen de las placas revela que todas las colonias bacterianas son idénticas, es probable que el organismo se encuentre en cultivo puro; si hay colonias bacterianas de diferentes tipos, indica que hay contaminantes. En cualquier caso la verificación de la patogenicidad de cualquier bacteria se hace por medio de cultivos puros de aquel o aquellos sospechosos aplicando los postulados de Koch. Para aislar y obtener un cultivo puro de la placa original se toma con una asa u aguja una colonia individual y con ellas se raya otra placa o se agita en un medio líquido y posteriormente se raya el agar.

Requerimientos.

Las condiciones necesarias para cultivar un patógeno bacteriano pueden ser muy específicas por lo cual hay que consultar en cada caso la literatura al respecto. Como medio solidificante se usa el agar del 15 al 2% pero es frecuente añadir vitaminas o carbonatos para el medio.

Estructura y Morfología.

La mayoría de las bacterias fitopatógenas presentan la forma de varilla o bacilar. A veces una especie bacteriana puede presentar diversas formas y a esto lo llamamos pleomorfismo. El tamaño de las varillas es de 0.4 - 0.7 μ de diámetro por 1.0 a 3.0 μ en longitud. Los miembros del género *Streptomyces* no encajan en estas dimensiones ya que existen como filamentos.

La pared celular; rodeada por un material capsular, encierra el protoplasma celular. Más allá de la pared celular y limitando el proto-

plasma se encuentra la membrana del plasma. El protoplasma contiene miles de ribosomas (estructuras que contienen ARN y proteína) membranas y uno o más nucleoides o cromosomas.

Las bacterias carecen de la membrana típica que limita el núcleo, así como de los mitocondrios que se observan en plantas superiores y especies animales.

Pared celular.

Es una estructura rígida y fuerte que protege las partes celulares biológicas más activas. Varía de 100 a 250 A (1 u = 10 000 A), en ancho y generalmente es más gruesa en las bacterias gram negativas que en las gram positivas.

Material capsular o mucílago.

Rodeando la pared celular en la mayoría de las bacterias, se encuentra una cubierta de material suelto llamado cápsula, microcápsula o mucílago de acuerdo a su grosor. En algunos casos parece ser que este material está asociado con la patogenicidad de las bacterias (constan de polisacáridos viscosos, los cuales se depositan en los vasos y ocasionan bloqueo o pueden ser en sí tóxicos).

Protoplasto.

Consta de membranas, mesosomas, nucleoides e inclusiones.

La membrana del plasma es simple y está compuesta de lipoproteínas. Su grueso es de 50 a 80 A y regula el paso de los materiales hacia dentro o hacia fuera de la célula. Se ha comprobado que algunas enzimas por ejemplo permeasa y agunas oxidativas se encuentran asociadas con

las actividades de dicha membrana. Las inclusiones en esta membrana que llegan a la célula se llaman mesosomas.

También se encuentra material nutritivo de reserva en gránulos y glóbulos constituido principalmente por polisacáridos y lípidos.

Aunque la célula bacteriana no contiene un núcleo típico como el presente en las plantas superiores, se presentan uno o dos nucleoides, los cuales carecen de membrana. La forma del nucleoide es variable y se puede distinguir fácilmente del resto del contenido celular mediante tinciones adecuadas.

El componente principal de los nucleoides es el ADN en el que se encuentra la información genética de la célula.

Flagelos.

Los flagelos bacterianos son delgados, enrollados a veces en espiral y se pueden localizar en varios géneros de bacterias fitopatógenas, son los órganos locomotivos y se originan en una estructura llamada blefaroplasto, la cual se localiza en la membrana del plasma. El número y la localización de los flagelos varía dentro de los diferentes géneros bacterianos.

La presencia de un solo flagelo en una célula bacteriana se denomina monotrico o uniflagelar. El arreglo más o menos uniforme de los flagelos sobre la superficie de la célula se le llama peritrico y es característico del género *Erwinia*.

El término multitrico o multiflagelado se usa para señalar la presencia de más de un flagelo polar.

Variación.

Las bacterias pueden sufrir cambios temporales o permanentes. Las variaciones temporales pueden ser morfológicas o fisiológicas y son inducidas por cambios en las condiciones físicas o químicas del ambiente en que se desarrollan. La reversión a la forma normal ocurre rápidamente si las condiciones se normalizan. Por otra parte las variaciones permanentes tienen lugar por cambios en el ADN bacteriano lo cual puede ocurrir de diferentes modos. En este caso la reversión a la forma normal ocurre muy rara vez. Las variaciones permanentes pueden ser importantes en los caracteres patogénicos de las bacterias y pueden tener lugar de la siguiente manera:

- 1.- Mutaciones
- 2.- Transformación.
- 3.- Lizogenización.
- 4.- Transducción.
- 5.- Conjugación.



BIBLIOGRAFIA

- Agrios, George N.- Fitopatología.
Editorial Limusa, México.
- Costa, J. J.- Introducción a la terapéutica vegetal.
_____ Editorial Hemisferio Sur.
- Charles Walker, John.- Patología vegetal.
Ed. Ediciones Omega, S.A. España.
- Christie, Jesse E., Dr.- Nemátodos de los vegetales.
1970. Editorial Limusa, México.
- DeBach, Paúl.- Control Biológico de las plagas de insectos
y malas hierbas.
_____ Compañía editorial continental, S.A., México.
Estación Federal de Investigaciones Agronómicas.- La defensa
de las plantas cultivadas.
_____ Ediciones Omega, S.A., España
- González, Luis Carlos.- Introducción a la Fitopatología.
1976. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
San José, Costa Rica.
- Juscafresa, Baudillo.- Lucha contra los parásitos vegetales.
_____ Editorial Sintet, S.A., Barcelona.
- Manners, J. G.- Introducción a la Fitopatología.
Editorial Limusa, México.
- Subcomité de los Patógenos de las Plantas, et al.- Desarrollo
y control de las enfermedades de las plantas.
Control de plagas de plantas y animales, Vol.1
_____ Editorial Limusa, México.

Urquijo, Landaluze. et. al.- Patología vegetal agrícola.

1971. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España.

Walter, William G. et. al.- Microbiología General.

_____ Compañía Editorial Continental, S.A. México.