

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN EL GÉNERO *MYCOBACTERIUM*.

Oriani, D.S.¹; Bruni, M.²; Alvarez Rubianes, N.¹

¹Cátedra de Microbiología Especial y Virología. ²Cátedra de Biología. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLPam. General Pico. La Pampa.

RESUMEN

En el presente trabajo se analiza la importancia de la microscopía electrónica como herramienta en el estudio de microorganismos. Se realiza además un análisis de los distintos métodos de trabajo en muestras bacteriológicas en microscopio de transmisión confeccionando un protocolo de trabajo adaptado a las características estructurales de las micobacterias ambientales.

Electronic Microscopy in *Mycobacterium*

SUMMARY

In the present work the importance of electronic microscopy is analyzed as a tool in the study of microorganisms. Besides, an analysis of different working methods on bacteriologic samples is done in transmission microscope preparing a work protocol adjusted to the structural characteristics of the environmental mycobacteria.

INTRODUCCIÓN

Muchos de los avances de la microbiología están ligados al perfeccionamiento del microscopio. El examen microscópico de los microorganismos se realiza con microscopio óptico y/o electrónico. Si bien el microscopio óptico ha tenido una importancia crucial en el desarrollo de la microbiología como ciencia, ya sea, desde los rudimentarios microscopios del siglo XVII de Robert Hooke, y de Antony van Leeuwenhoek, hasta los actuales microscopios ópticos de campo claro, campo oscuro, fluorescencia y contraste de fase de suma utilidad en la microbiología clínica, no aportan al conocimiento de la estructura íntima de las células, debido al escaso poder de resolución que presentan: 0,2 μ m.

La resolución del microscopio de luz (d) aumenta cuando disminuye la longitud de onda (λ) de la luz utilizada en la iluminación (Ecuación de Abbé):

$$d: 0,5\lambda / n \text{ sen } \theta.$$

Con el descubrimiento de los electrones por Thomson, en 1897, y simultáneas investigaciones sobre campos magnéticos y eléctricos por importantes físicos como Broglie, Schrodinger, Davisson y Reid, entre otros, contribuyeron a que Ruska en 1930 desarrollara el primer microscopio electrónico, donde los electrones generados por un filamento de tungsteno en alto vacío y desplazados por lentes solenoides se comportaban como rayos de luz.

Los primeros microscopios electrónicos presentaban un poder de resolución de 10 nm y hacia 1949 se había logrado llegar a 1 nm. Cuando los electrones “iluminan” el espécimen la resolución del microscopio aumenta enormemente debido a que la longitud de onda de dicha radiación es de aproximadamente 0,005 nm, unas 100.000 veces menor que la de la luz visible, otorgándole al microscopio electrónico de transmisión un poder de resolución de 0,5 nm, lo cual permite la visualización y estudio de estructuras celulares (Prescott et al., 1996).

El primer ensayo exitoso que permitió visualizar la anatomía de las células bacterianas por microscopía electrónica lo realizaron Chapman y Chapman en el año 1959, mediante secciones finas de *Bacillus cereus*. La visualización de la estructura bacteriana puede diferir de acuerdo al fijador químico empleado. Así por ejemplo, una bacteria fijada directamente con tetróxido de osmio ($Os O_4$) presentará el material nuclear en forma fibrilar, mientras que si la fijación se realiza en glutaraldehído - acetato de uranilo, o bien glutaraldehído - $Os O_4$ el material nuclear es coagulado y condensado. Otros factores, tales como la osmolaridad, ausencia y/o presencia de cationes y su concentración en el buffer empleado, la temperatura de fijación, así también si las células son fijadas directamente en el medio de cultivo o bien si son previamente centrifugadas, afectan la morfología celular. Los iones uranilo y los cationes bivalentes parecen ser esenciales en la fijación ya que forman enlaces cruzados con las proteínas celulares, actuando como fijadores fuertes (Holt y Beveridge, 1981).

Las técnicas empleadas en microscopía electrónica deben ser modificadas de acuerdo a la arquitectura básica de la célula bacteriana a investigar. Así por ejemplo, las bacterias Gram negativas presentan en la pared celular más lípidos que las bacterias Gram positivas, algunas bacterias carecen de pared celular, otras presentan cápsulas de polisacáridos. Algunas células elaboran un gran sistema intracitoplasmático de membranas, otras presentan esporas como forma de resistencia a las condiciones adversas, mientras que otras almacenan nutrientes en gránulos intracitoplasmáticos. Hay bacterias móviles debido a que presentan pilis y/o flagelos externos y en algunos casos flagelos periplasmáticos.

Dentro de los géneros bacterianos clasificados por el manual Bergey se encuentra el género *Mycobacterium*. Este género se caracteriza por que son bacterias Gram (+), con alto contenido de guanina citocina (62-71 mol %), cuya pared presenta un alto contenido de lípidos, ceras y ácidos micólicos. El género *Mycobacterium* presenta especies patógenas y potencialmente patógenas para el hombre y los animales, y otras especies que son saprófitas. La patogenicidad del género *Mycobacterium* reside en la pared celular, debido al alto contenido de lípidos de la misma (60 % del peso seco de la pared) que le confieren a estos microorganismos propiedades tales como: la ácido alcohol resistencia; la disposición en empalizada y la formación de cordones; un prolongado tiempo de generación (hasta 18 hs.); sobrevida a la lisis de las enzimas lisosomales del macrófago, con la consiguiente reproducción intracelular, originando así infecciones de curso crónico .

Muchos de los componentes de la pared celular, del género *Mycobacterium*, tales como polisacáridos, proteínas y lípidos, son antigénicos. Algunos de ellos son específicos de especie, mientras que otros son compartidos por varias especies del mismo género (Harboe et al., 1992).

La pared celular es entonces responsable tanto de la patogenicidad como de desencadenar inmunidad en el huésped infectado. Dicha inmunidad celular se evidencia a través de la reacción de Mantoux (PPD).

Si bien se conoce la estructura de la pared celular del *Mycobacterium tuberculosis*, se desconoce la composición de la misma en las micobacterias saprófitas, que, aunque no producen patogenicidad, es posible que interfieran en el diagnóstico de la tuberculosis animal a través de la PPD.

El estudio de la pared celular de las especies saprófitas del género *Mycobacterium* mediante técnicas de microscopía electrónica complementará estudios inmunológicos en animales de laboratorio en pos de esclarecer la posible interferencia en el diagnóstico de la tuberculosis animal "in vivo".

MATERIALES Y MÉTODOS

Se detallan una serie de protocolos para microscopía electrónica de transferencia (MET) en bacterias con algunas semejanzas estructurales al género *Mycobacterium*:

Según la publicación de Enrique Ramírez Bon (1991), de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, se utiliza el siguiente protocolo:

- 1) Cultivo bacteriano en medio líquido: centrifugado a 14000 r.p.m. en centrífuga ependorff.
- 2) Fijación primaria: al sedimento bacteriano se le agrega glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato 0,2 M durante 1 hora a 4 °C.
- 3) Se centrifuga a 14.000 r.p.m. y se retira el sobrenadante. El sedimento se resuspende en el buffer fosfato (pH 7,2) y se vuelve a centrifugar. De esta manera se realizan 3 lavados.
- 4) Fijación secundaria con tetróxido de osmio al 2%, en el buffer fosfato 0,1 M con el agregado de 3% de sacarosa, durante 2 hs., a la misma temperatura que la fijación primaria.
- 5) Deshidratación: las células bacterianas se concentran por centrifugación, y son deshidratadas por concentraciones crecientes de etanol en el siguiente esquema:

Deshidratante	Proporción (%)	Tiempo (min.)
Etanol	60	15
Etanol	70	15
Etanol	80	15
Etanol	90	15
Etanol	95	15
Etanol	100	10
Etanol	100	10
Etanol	100	10
Oxido propileno	100	15
Oxido propileno	100	15

- 6) Preinclusión: las células son nuevamente centrifugadas para su concentración y son embebidas en resinas EPON 812 de acuerdo al siguiente esquema:

Proporción Solvente - resina		Tiempo (horas)
3	1	2
1	1	2
1	3	12

- 7) Inclusión: las células al finalizar la preinclusión son incluidas en resina al 100%. El block se forma en moldes de plástico y se deja polimerizar a 65 °C, durante 24 a 72 hs.
- 8) Cortes con ultramicrotómicos modelo LKB 2088 tipo térmico, con cuchilla de diamante.
- 9) Montaje: grillas de cobre de 200 mallas.

- 10) Contrastado: suspendido de la grilla en acetato de uranilo 5 minutos, lavado con agua bidestilada y posteriormente suspendido de la grilla en citrato de plomo durante 3 minutos. Se vuelve a lavar con agua bidestilada.
- 11) Observación de los cortes con MET 60 Kv .

El protocolo de la Universidad Nacional de la Plata (Petruccelli et al., 1997) se basa en los siguientes fases del proceso:

Crecimiento bacteriano en medios sólidos.

- 1) Fijar las células en la misma placa de petri donde desarrollaron, con una solución de glutaraldehído al 2%, durante 20 minutos, a temperatura ambiente.
- 2) Retirar la solución fijadora y lavar 3 veces con PBS, durante 5 minutos cada una.
- 3) Postfijar con tetróxido de osmio al 1%, durante 20 minutos.
- 4) Retirar el fijador, repetir el lavado de acuerdo al punto 2) .
- 5) Levantar el cultivo bacteriano con ayuda de espátula de goma y el agregado de unos ml de PBS. Centrifugar las células a 3.000 r.p.m., 5 minutos. Retirar el PBS y colocar el pellet a baño María a 45 °C durante 5 minutos, agregar agar al 4% en una proporción de 1:1 con el pellet de células, incubar bajo agitación durante 10 minutos. Enfriar y esperar que solidifique el agar, para luego deshidratar.
- 6) Deshidratación: acetona 10 al 100%.

Deshidratante	Proporción (%)	Tiempo (min.)
Acetona	20	10
Acetona	30	10
Acetona	40	10
Acetona	50	10
Acetona	60	10
Acetona	70	10
Acetona	80	10
Acetona	90	10
Acetona	100	10
Acetona	100	10

7) Preinclusión: con resinas Spurr en el siguiente esquema:

Solvente	Resina	Tiempo hs
3	1	2
1	1	2
1	3	2
0	4	3
0	4	3

- 8) Inclusión en Spurr 100% en bloque. Polimerización a 72 °C, 12 hs.
- 9) Cortes con ultramicrotomo cuchilla de diamante.
- 10) Montaje en grillas de cobre .
- 11) Contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo.

12) Observación en MET 60 kv.

Protocolo según Silva y Macedo (1984):

Cultivo de micobacterias saprófitas en medio líquido, concentradas por centrifugación (2.500 g, por 10 minutos). En el caso de *Mycobacterium leprae*, debido a que no es posible cultivarlo “in vitro” se recoge líquido de cavidad abdominal de armadillo, previamente inoculado con material infeccioso.

- 1) Fijación con 4% (w/v) formaldehído más glutaraldehído 1-2,5% (w/v) con el agregado de 10 mM Ca²⁺ (GaFaCa) a temperatura ambiente, durante uno a varios días.
- 2) Fijación: 1 % (w/v) tetróxido de osmio, con el agregado de 10 mM Ca²⁺, durante 16-24 hs.
- 3) Fijación terciaria con 0,5 % (w/v) acetato de uranilo en buffer veronal acetato o en agua destilada, durante una hora.
- 4) Deshidratación en concentraciones crecientes de etanol.
- 5) Infiltración en resinas Epon.
- 6) Contratación con citrato de plomo durante 5 minutos o bien con PAS . En este último se pueden seguir dos técnicas:

Thiery (1967)	PTA bajo pH (1975)
Ácido periódico 1% 30 min.	Ácido periódico 1% 15 min.
Tiosemicarbazide 1% 60 min.	Ácido fosfotúngstico en 1 M-HCl 15 min.
1% de Silver proteinato	

7) Observación en Siemens (Elmiskop IA y 112)

Silva et al. (1989) elaboraron otro protocolo:

- 1) Fijación con tetróxido de osmio al 1% en buffer Palade veronal acetato, pH 6,0 suplementado con 10 mM Ca²⁺ durante 16 a 24 hs., a temperatura ambiente.
- 2) Varios lavados con 50 mM de buffer Cacodilato, suplementado con 10 mM Ca²⁺, pH 7,0.
- 3) Postfijación con GaFaCa durante 24 hs., a temperatura ambiente.
- 4) Lavados con agua.
- 5) Postfijación en solución acuosa al 1% de acetato de uranilo durante 1 h., a temperatura ambiente.
- 6) Deshidratación en gradientes de etanol.
- 7) Infiltración con resinas Epon.
- 8) Secciones ultrafinas se efectuaron con ultramicrotomo LKBIII .
- 9) Contrastado con citrato de plomo durante 5 minutos, o bien por el método de Thiery.
- 10) Observación con Siemens Elmiskop 1 A o 102.

Según Veiga et al. (1997):

Los microorganismos se cultivan en medios líquidos: se concentran las células por medio de filtros Millipore.

- 1) Fijación con glutaraldehído al 3% más 0,5 % de Alcian Blue en 0,1M de Buffer cacodilato (pH 7,2), durante 2hs. a temperatura ambiente.
- 2) Lavados con buffer cacodilato 0,2 M durante 1 hora (6 lavados de 10 minutos cada uno).

- 3) Postfijación con tetróxido de osmio al 1% y 1% de nitrato de Lantanun (LaNO_3) en buffer cacodilato 0,2 M y pH 7,2 a temperatura ambiente.
- 4) Lavado igual que el paso 2).
- 5) Deshidratación con gradientes de etanol, terminando con oxido de propileno.
- 6) Imbibición en Poly/Bed 812.
- 7) Secciones finas con cuchilla de diamante montadas en ultramicrotomo LKB .
- 8) Contrastado con Acetato de uranilo y citrato de plomo.
- 9) MET Philips CM-10 con voltaje de aceleración de 80 kV .

Protocolo de Hespell et al. (1993).

Utiliza un cultivo bacteriano en medio líquido.

- 1) Las células bacterianas son concentradas por medio de centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C.
- 2) El pellet se resuspende en buffer cacodilato al 0,1 M con 20% de medio de cultivo, conteniendo además 5% v/v de glutaraldehído. Se mantiene en este fijador primario durante toda la noche a 4 °C y con agitación suave.
- 3) La suspensión celular es centrifugada 10.000 g 10 min. 4 °C. El pellet se resuspende en buffer cacodilato 0,1 M, conteniendo 0,05 w/v de Rojo de Rutenio.
- 4) Lavados como en el ítem 2).
- 5) Las células son embebidas en agar, previa centrifugación .
- 6) Deshidratación.
- 7) Infiltración.
- 8) Inclusión .
- 9) Ultramicrotomo Reichert OM U2.
- 10) Contrastado con citrato, previa evaporación con carbón.
- 11) Las preparaciones son examinadas con Hitachi 5400 con aceleración de voltaje de 60KV.

Protocolo según Smith et al. (1994).

Se parte de cultivos en medios líquidos:

- 1) Fijación con acroleína al 5% y glutaraldehído al 0,25%, en buffer cacodilato 0,1 M y pH 7,3 con el agregado de rojo de rutenio, durante toda la noche a 4 °C.
- 2) Lavados con buffer cacodilato 0,1 M.
- 3) Las células son resuspendidas en 0,5% de ácido tánico en buffer durante 30 minutos.
- 4) Lavados.
- 5) El pellet es embebido en 2% de agar Noble.
- 6) Los bloques de agar son postfijados en tetróxido de osmio al 1%, conteniendo 0,1% de rojo de rutenio, durante 1 hora a 4 °C.
- 7) Lavados.
- 8) Fijación terciaria con acetato de uranilo 1% durante 2 hs. a temperatura ambiente.
- 9) Deshidratación con etanol en serie de gradientes de concentración.
- 10) Infiltración en resinas Spurr.
- 11) Secciones finas con ultramicrotomo Reichert OMU2
- 12) Contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo.
- 13) Las envolturas bacterianas se colorean negativamente con acetato de uranilo al 1% conteniendo 1 mg/ml de bacitracina para facilitar la penetración.
- 14) MET Philips EM 300 60 KV.

Protocolo según Page et al. (1995):

Se parte de un cultivo bacteriano en medio líquido.

A) Fijación química.

- 1) El cultivo bacteriano es mezclado con igual volumen de glutaraldehído al 5% con 0,1 M de buffer fosfato, 1h. a temperatura ambiente.
- 2) Centrifugación a bajas revoluciones por 5 minutos.
- 3) El pellet es lavado cuidadosamente 3 veces con 5 ml de buffer fosfato, durante 10 minutos y con centrifugaciones de 5 minutos entre cada lavado.
- 4) El pellet es colocado en 2,5 ml de tetróxido de osmio al 1% (en buffer fosfato) y resuspendido en un volumen mínimo de agar al 2%, durante toda la noche .
- 5) Esquema de deshidratación:

Deshidratante	Proporción (%)	Tiempo (min.)
Acetona	25	15
Acetona	50	15
Acetona	75	15
Acetona	90	15
Acetona	100	10
Acetona	100	10

- 6) Esquema de infiltración: Resina empleada: LX112

Solvente	Resina	Tiempo (hs.)
3	1	1
1	1	1
1	3	1
0	4	12

- 7) Polimerización : 60 °C, 24 hs.
- 8) Cortes con cuchillas de cristal.
- 9) Contrastado con acetato de uranilo y citrato de plomo.
- 10) Observación: Philips EM410 MET con voltaje de aceleración de 80 KV.

B) Sustitución en frío:

- 1) El cultivo bacteriano en medio líquido, suplementado con glucosa y peptona de pescado, es colectado por centrifugación y enfriado rápidamente en propano líquido. No se usan pretratamientos con crioprotectores.
 - 2) Para reemplazar el agua de la célula bacteriana se utiliza acetato de uranilo al 2% y tetróxido de osmio al 2% en acetona anhidra o etanol anhidro.
 - 3) Infiltración en Epon 812.
- El resto del protocolo continúa como el A).

Protocolo según Miguez et al. (1986):

- 1) Las células bacterianas son lavadas con 0,05 M Hepes (N-2hydroxyethilenpiperazine N'2 ácido ethanesulfónico, pH 6,8)
- 2) Fijación con 5% de glutaraldehído, en el mismo buffer a temperatura ambiente.
- 3) Lavados.
- 4) Postfijación con tetróxido de osmio al 1% durante 120 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Lavados.
- 6) Fijación terciaria con acetato de uranilo al 1% durante 120 minutos.
- 7) Deshidratación con etanol-óxido de propileno.
- 8) Infiltración en resinas Epon 812.
- 9) Contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo.
- 10) MET Philips EM 300 voltaje de aceleración 60KV.

Protocolo de Brown et al. (1995):

Se embeben las células bacterianas en agar al 2,5%.

- 1) Fijación primaria: glutaraldehído 2,5 % y formaldehído al 2,5 % en Buffer Cacodilato 0,2 M con el agregado de Alcian Blue al 0,05%, durante 20 min. a temperatura ambiente.
- 2) Dos lavados con buffer cacodilato y refrigeración a 4 °C durante toda la noche.
- 3) Fijador secundario: tetróxido de osmio al 1% con el agregado de 0,05% de Alcian Blue, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Lavados igual que 2).
- 5) Deshidratación siguiendo el esquema:

Deshidratante	Proporción (%)	Tiempo (min.)
Etanol	25	15
Etanol	50	15
Etanol	75	15
Etanol	95	15
Etanol	100	15
Acetona	100	15
Acetona	100	15
Acetona	100	15

6) Infiltración con resinas Spurr :

Resina	Tiempo (hs.)
30%	2
70%	2
100%	2

- 7) Polimerización a 60 ° C durante 12 hs.
- 8) Cortes ultrafinos.
- 9) Grillas de cobre de 100 mesh.
- 10) Acetato de uranilo 1% y citrato de plomo 1% durante 10 minutos cada uno.
- 11) Observación Zeiss EM 10.

SINTESIS DE PROTOCOLOS PARA M.E.T.

P. N°	Fijación 1 ^{aria} .	Vehículo	Fijación 2 ^{daria}	Fijación 3 ^{aria} .	Deshidr.	Infil.-inclus.	Contrastado
1	Glut.2,5% 2 hs. 4°C	Buffer fosfato 0,2M	OsO ₄ +sacarosa al 3%, 2 hs.	NI	Etanol de 60-100 óxido propileno	Epon 812	acetato uranilo-citrato de plomo (5 y 3 minutos respectivamente)
2	Glut. 2%, 20 minutos	PBS	1% Os O ₄ 20 min.	NI	Acetona *	Spurr *	acetato de uranilo - ctrato de plomo.
3	*Formaldehído 4% + Glutaraldehído 1-2,5% con 10mM Ca ²⁺ 1 a más días. T. A.	*Buffer cacodilato 50mM + 10mM Ca ²⁺	*1% OsO ₄ (w/v) + 10 mM Ca ²⁺ . Temp.ambiente 16-24 hs.	Acetato de uranilo 0,5% en buffer veronal 1h. TA.	Etanol	Epon	Citrato de plomo o Acido periódico de Schff (PAS):pH ácido, pH neutro(Thiery).
4	OsO ₄ 1% en buffer veronal pH 6 + 10 mM Ca ²⁺ . T. A. 16-24 hs.	Buffer Cacodilato 50 mM + 10 mM Ca ²⁺ .	Glutaraldehído 4% + Formaldehído 1-2,5% + 10 mM Ca ²⁺ 24 hs. T.A.	**Acetato de Uranilo 1% 1 h. TA.	Etanol	Epon	*Citrato de plomo 5min. o Thiery
5	Glutaraldehído 3% 0,5 % Alcian Blue 2h. TA.	Cacodilato 0,1 y 0,2 M	LaNO ₃ 1% + Os O ₄ 1%	NI	Etanol-oxido de propileno	Poly/B ed 812	Acetato de Uranilo-Citrato de Plomo.
6	Glutaraldehído 5%	Cacodilato 0,1 M +20% medio de cultivo	Rojo de Rutenio 0,05 w/v en buffer cacodilato	NI	NI	NI	Carbon y citrato.
7	Glutaraldehído 0,25% + acroleina 5%+ rojo rutenio 0,1% 12 hs. 4C	Cacodilato 0,1 M	0,5% de Acido Tánico 30 min. Tetróxido de osmio 1% + Rojo de rutenio 0,1%	Acetato de uranilo 1 % 2 hs. a TA.	Etanol	Spurr	Acetato de uranilo + citrato de plomo Contraste negativo: acetato de uranilo al 1 % + bacitracina 1mg/ml.
8	Glutaraldehído 2,5% . 1h. TA	Buffer fosfatos 0,1M	Tetroxido de osmio 1%	NI	Acetona	LX112	Aacetato de uranilo-citrato de plomo
9	Glutaraldehído 5%. T.A.	Hepes.	OsO ₄ 1% 120 min.TA	Acetato de uranilo 1% 120 min.TA.	Etanol-óxido de propileno	Eon 812	Acetato de Uranilo-Citrato de plomo.
10	Glutaraldehído 2,5% + Formaldehído 2,5 % + Alcian Blue 0,05% . 20 min. a TA.	Buffer Cacodilato 0,2 M.	OsO ₄ 1% + Alcian Blue al 0,05% 30 min. TA.	NI	Enanol-Acetona	Spurr	Acetato de uranilo1% 10 min Citrato de plomao 1% 10 min.

* procedimientos escogidos como apropiados en la elaboración del protocolo de MET para micobacterias ambientales; NI: no indicada.

CONCLUSIONES

De los métodos utilizados se sugiere el siguiente protocolo de trabajo:

- 1) Las micobacterias ambientales se cultivan en medios de Stonebrink.
- 2) La fijación se realiza con formaldehído 4% más glutaraldehído 1-2,5% con 10 mM Ca²⁺ uno a más días a temperatura ambiente
- 3) El vehículo utilizado es buffer cacodilato 50 mM más 10 mM Ca²⁺.
- 4) La fijación secundaria se realiza con 1% OsO₄ (w/v) más 10 mM Ca²⁺, a temperatura ambiente, 16-24 hs.
- 5) Se realiza una fijación terciaria con acetato de uranilo 1 % 1h a temperatura ambiente
- 6) Se deshidrata con acetona.
- 7) La infiltración es con resinas Spurr.
- 8) El contraste se hace con citrato plomo o ácido periódico de Schiff (PAS).

Se sugiere este esquema debido a que las micobacterias presentan lento crecimiento y con ello se favorece la contaminación. De esta manera se detectan fácilmente las colonias contaminantes, no así en los medios líquidos.

BIBLIOGRAFÍA

- Brown, M.; Aldrich, H.; Gauthier, J.** 1995. Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 187-193.
- Harboe, M.; Wiker, H.; Nagai, S.** 1992. Protein antigens of mycobacteria studied by quantitative immunologic techniques. *Clin. Infect. Dis.* 14: 313-319.
- Hespell, R.; Kato, K.; Costerton, J.** 1993. Characterization of the cell wall of *Butivibrio* species. *Can. J. microbiol.* 39: 912-921
- Holt, S.C.; Beveridge, T. J.** 1982. Electron microscopy: its development and application to microbiology. *Can. J. Microbiol.* 28: 1-53.
- Miguez, C.; Beveridge, T.; Ingram, J.** 1986. Lipopolysaccharide changes and cytoplasmic polyphosphate granule accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* during growth on hexadecane. *Can. J. Microbiol.* 32: 248-253.
- Page, W.; Sherburne, R.; D'Elia, L.; Graham, L.** 1995. Poly (B-hydroxybutyrate) extrusión from pleomorphic cells of *Azotobacter vinelandii* UWD. *Can. J. microbiol.* 41: 22-31.
- Petrucelli, M; Aguirre, J.; Jurado, S.; Armocida, A.** 1997- UNLP, Fac. Cs. Veterinarias. Folleto de divulgación del servicio de Microscopia Electrónica.
- Prescott, L.; Harley, J.; Klein, D.** 1996. *Microbiology*. Third Edition, WM, Brown Publishers.
- Ramirez Bon, Enrique.** 1991. Publicación personal. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Silva, M.; Macedo, P.** 1984. Ultrastructural characterization of normal and damaged membranes of *Mycobacterium leprae* and of cultivable *Mycobacteria*. *J. General Microbiology* 130: 369-380.
- Silva, M.; Portaels, F.; Macedo, P.** 1989. New data on the ultrastructure of the membrane of *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr.* 57: 54-64.

Smith, S.; Murray, R.; Hall, M. 1994. The surface structure of *Leptotrichia buccalis*. *Can. J. microbiol.* 40: 90-98.

Veiga, M.; Jain, M.; Wu, W.; Hollingsworth, R.; Zeikus, G. 1997. Composition and role of extracellular polymers in methanogenic granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 403-407.