

10524
43



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN



Departamento de
Investigación y Profesores

"ESTABLECIMIENTO DE UN CEPARIO DE BACTERIAS
Y HONGOS PARA EL MEJORAMIENTO DE LA
ENSEÑANZA EXPERIMENTAL EN EL AREA DE
MICROBIOLOGIA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

RAFAEL MEZA HERNANDEZ

ASESORAS: MIC ESP AMPARO LONDOÑO OROZCO
M V Z MERCEDES SALGADO MORENO
M V Z LUZ MARIA ORTEGA LEYVA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Establecimiento de un cepario de bacterias y hongos para el mejoramiento de la enseñanza experimental en el área de microbiología",

que presenta el pasante: Rafael Meza Hernández
con número de cuenta: 8807015-9 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de Junio de 2002

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>M.V.Z. Tonatiuh Cruz Sánchez</u>	
SECRETARIO	<u>Q.B.P. Amparo Londoño Orozco</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Marcela Hernández Vargas</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Virginia Benítez Solís</u>	

**TESIS CON
FALLA DE
ORIGEN**

“...¿no será que solo somos bichitos que viven dentro de otro bicho más grande, y que éste a su vez vive dentro de otro bicho más grande?.”

*EXTRACTO APROXIMADO DEL CUENTO “DOS AMIBAS
AMIGAS”*

“Como es arriba es abajo, como es abajo es arriba”

PROVERBIO METAFÍSICO

“Cuando abras un libro, estudia y no leas.”

PROVERBIO ELIASISTA

AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD, LA FACULTAD Y LA CARRERA

Por haberme formado en lo académico, profesional y sobre todo en mi voluntad y determinación para lograr mis metas.

A LA SECCIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD HUMANA

Por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

A MIS ASESORAS

Por su apoyo y la oportunidad de conocer durante este tiempo de convivencia su lado humano.

A LOS PROFESORES DE LA SECCIÓN

Quienes aunque no todos hayan participado de alguna manera en este proyecto me ofrecieron consejos y apoyo para la realización del mismo, por lo cual me complace de contar con algunos de ellos entre mi jurado.

A LA SECCIÓN DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Por su colaboración para poder tomar algunas de las fotografías que figuran en esta tesis.

A MIS DETRACTORES

Quienes han dado el mayor valor a este trabajo al poner su atención en él durante su realización, ya que solo puede ser negado lo que es.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por haberme permitido llegar a este momento y por todo lo recibido, lo cual solo puedo agradecer del único modo que sé:

*“Gracias Señor, te den
los ángeles por mí,
pues nunca merecí
tal dicha y tanto bien.”*

A MI FAMILIA

Sin cuyo ejemplo, apoyo y herencia de fortaleza no hubiera logrado concluir ningún objetivo.

A LOS INTEGRANTES DE LA GENERACIÓN 18 DE Q.F.B.

Con quienes compartí momentos de duro trabajo y buenos ratos.

***A LOS INTEGRANTES DE LAS DISTINTAS GENERACIONES Y
CARRERAS***

Quienes me brindaron su apoyo cuando me conocieron.

A OLIVIA

*Que no pase un día sin que sigamos siendo amigos y no te rindas, es tu
turno ahora.*

A TI

La única que ha logrado lo imposible. T.Q.M.

ÍNDICE

RESÚMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. ANTECEDENTES HISTÓRICOS	5
I.I MÉTODOS DE CONSERVACIÓN	
I.II COLECCIONES MICROBIOLÓGICAS	
CAPÍTULO 1 LA ORGANIZACIÓN DEL CEPARIO	10
1.1 ORGANIZACIÓN TÉCNICA	
1.1.1 EL PERSONAL	
1.1.2 DISTRIBUCIÓN JERÁRQUICA DEL PERSONAL	
1.1.3 FUNCIONES DEL PERSONAL	
1.2 ORGANIZACIÓN ADMINISTRATIVA	13
1.2.1 REGISTRO DE CEPAS	
1.2.2 BITÁCORAS	
1.2.3 ARCHIVO DEL CEPARIO	
1.2.4 REGLAMENTO	
CAPÍTULO 2 BACTERIAS	31
2.1 COCOS GRAM POSITIVOS	34
2.1.1 Staphylococcus	
2.1.2 Streptococcus	
2.2 BACILOS GRAM POSITIVOS NO ESPORULADOS	43

2.2.1	<i>Corynebacterium</i>	
2.2.2	<i>Listeria</i>	
2.3	BACILOS GRAM POSITIVOS ESPORULADOS	50
2.3.1	<i>Bacillus</i>	
2.3.2	<i>Clostridium</i>	
2.4	BACTERIAS GRAM NEGATIVAS ENTÉRICAS	57
2.5	BACTERIAS GRAM NEGATIVAS NO ENTÉRICAS	62
2.5.1	<i>Pseudomonas</i>	
2.5.2	<i>Bordetella</i>	
2.5.3	<i>Haemophilus</i>	
2.5.4	<i>Actinobacillus</i>	
2.5.5	<i>Vibrio</i>	
2.6	ACTINOMYCETALES	76
2.6.1	<i>Mycobacterium</i>	
2.6.2	<i>Actinomadura</i>	
2.6.3	<i>Nocardia</i>	
2.6.4	<i>Streptomyces</i>	
CAPÍTULO 3	HONGOS	87
3.1	LEVADURAS	90
3.1.1	<i>Candida</i>	
3.1.2	<i>Cryptococcus</i>	
3.1.3	<i>Rhodotorula</i>	

3.2 HONGOS FILAMENTOSOS	101
OBJETIVOS	107
CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA	109
4.1 BACTERIAS	
4.1.1 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS	
4.1.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO	
4.1.3 CUENTA VIABLE	
4.1.4 CONSERVACIÓN	
4.1.5 EVALUACIÓN POST-CONSERVACIÓN	
4.2 HONGOS	111
4.2.1 IDENTIFICACIÓN DE HONGOS	
4.2.2 CONSERVACIÓN	
4.2.3 EVALUACIÓN POST-CONSERVACIÓN	
CAPÍTULO 5 RESULTADOS	113
5.1 BACTERIAS	114
5.1.1 CEPAS	
5.1.2 RECUPERACIÓN POST CONSERVACIÓN	
5.1.3 VIABILIDAD	
5.2 HONGOS	129
5.2.1 CEPAS	
5.2.2 RECUPERACIÓN POSTCONSERVACIÓN	
5.2.3 VIABILIDAD	

ANÁLISIS DE RESULTADOS	132
CONCLUSIONES	138
RECOMENDACIONES	140
REFERENCIAS	142
APÉNDICE	150

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 HOJA DE TRABAJO.	17
ESQUEMA 2 HOJA MAESTRA	22
ESQUEMA 3 SOLICITUD DE CEPAS	27

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1 DISTRIBUCIÓN DE CEPAS	113
GRÁFICA 2 DISTRIBUCIÓN DE BACTERIAS	116
GRÁFICA 3 RECUPERACIÓN CORTO PLAZO SIN SELLO	120
GRÁFICA 4 RECUPERACIÓN CORTO PLAZO SELLO DE CERA	121
GRÁFICA 5 RECUPERACIÓN CORTO PLAZO CERA Y ACEITE	122
GRÁFICA 6 RECUPERACIÓN MEDIANO PLAZO SIN SELLO	123
GRÁFICA 7 RECUPERACIÓN MEDIANO PLAZO SELLO DE CERA	124
GRÁFICA 8 RECUPERACIÓN MEDIANO PLAZO CERA Y ACEITE	125
GRÁFICA 9 RECUPERACIÓN LARGO PLAZO SIN SELLO	126
GRÁFICA 10 RECUPERACIÓN LARGO PLAZO SELLO DE CERA	127
GRÁFICA 11 RECUPERACIÓN LARGO PLAZO CERA Y ACEITE	128
GRÁFICA 12 DISTRIBUCIÓN DE HONGOS	131

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 IDENTIFICACIÓN DE <i>Staphylococcus</i>	38
TABLA 2 IDENTIFICACIÓN DE <i>Streptococcus</i>	42
TABLA 3 IDENTIFICACIÓN DE <i>Corynebacterium</i>	47
TABLA 4 IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria</i>	49
TABLA 5 IDENTIFICACIÓN DE <i>Bacillus</i>	53
TABLA 6 IDENTIFICACIÓN DE <i>Clostridium</i>	56
TABLA 7 MEDIOS DE CULTIVO PARA ENTEROBACTERIAS	59
TABLA 8 PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA ENTEROBACTERIAS	61
TABLA 9 IDENTIFICACIÓN DE <i>Pseudomonas</i>	66
TABLA 10 IDENTIFICACIÓN DE <i>Bordetella</i>	68
TABLA 11 IDENTIFICACIÓN DE <i>Haemophilus</i>	70
TABLA 12 IDENTIFICACION DE <i>Vibrio</i>	75
TABLA 13 BIOVARIEDADES DE <i>V. cholerae</i> 0:1	75
TABLA 14 IDENTIFICACION DE <i>Mycobacterium</i>	82
TABLA 15 DIFERENCIACIÓN DE ACTINOMICETOS	86
TABLA 15A DIFERENCIACIÓN DE ACTINOMICETOS (continuacion)	86
TABLA 16 REACCIONES DE CARBOHIDRATOS PARA LEVADURAS	100
TABLA 17 VIABILIDAD DE BACTERIAS A CORTO PLAZO	117
TABLA 18 VIABILIDAD DE BACTERIAS A MEDIANO PLAZO	118
TABLA 19 VIABILIDAD DE BACTERIAS A LARGO PLAZO	119

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

DIAGRAMA 1 JERARQUÍAS DEL PERSONAL	11
DIAGRAMA 2 SOLICITUD Y ENTREGA DE CEPAS	30
DIAGRAMA 3 DIFERENCIACIÓN DE COCOS GRAM POSITIVOS	35
DIAGRAMA 3A IDENTIFICACION DE <i>Staphylococcus</i>	38
DIAGRAMA 3B IDENTIFICACION DE <i>Streptococcus</i>	41
DIAGRAMA 4 DIFERENCIACIÓN DE BACILOS GRAM POSITIVOS NO ESPORULADOS	44
DIAGRAMA 4A IDENTIFICACION DE <i>Corynebacterium</i>	46
DIAGRAMA 4B IDENTIFICACIÓN DE <i>Listeria</i>	49
DIAGRAMA 5 DIFERENCIACIÓN DE BACILOS GRAM POSITIVOS ESPORULADOS	51
DIAGRAMA 5A IDENTIFICACION DE <i>Bacillus</i>	53
DIAGRAMA 5B IDENTIFICACION DE <i>Clostridium</i>	55
DIAGRAMA 6 IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS	60
DIAGRAMA 7 DIFERENCIACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS NO ENTÉRICOS	63
DIAGRAMA 7A IDENTIFICACION DE <i>Pseudomonas</i>	65
DIAGRAMA 7B IDENTIFICACION DE <i>Bordetella</i>	68
DIAGRAMA 7C IDENTIFICACION DE <i>Haemophilus</i>	70
DIAGRAMA 7D IDENTIFICACION DE <i>Vibrio</i>	74
DIAGRAMA 8 DIFERENCIACION DE ACTINOMYCETALES	78

DIAGRAMA 8A IDENTIFICACIÓN DE <i>Mycobacterium</i>	81
DIAGRAMA 8B IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS	85
DIAGRAMA 9 DIFERENCIACIÓN DE LEVADURAS	91
DIAGRAMA 9A IDENTIFICACIÓN DE <i>Candida</i>	94
DIAGRAMA 9B IDENTIFICACIÓN DE <i>Cryptococcus</i>	97
DIAGRAMA 9C IDENTIFICACIÓN DE <i>Rhodotorula</i>	99
DIAGRAMA 10 IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICELIALES	105

RESÚMEN

En el presente trabajo se realizaron pruebas de conservación de 67 cepas, 39 bacterias y 28 hongos a diferentes plazos, temperaturas y métodos de sellado para los tubos de conservación.

Se encontró que para todas las bacterias, con excepción de los géneros *Bacillus* y *Streptococcus*, las condiciones de conservación más adecuadas son el sellado con cera a 4°C y no más de un plazo mediano.

En los hongos se observó buena recuperación en tubos sin sello a 4°C hasta por 18 meses a excepción de *Epidermophyton floccosum*, el cual no resiste las bajas temperaturas.

INTRODUCCIÓN

Un cepario microbiológico es una colección de microorganismos los cuales son obtenidos, purificados, identificados y conservados con el propósito de que puedan ser utilizados posteriormente en los diversos proyectos en los cuales se requiera que tales cepas se encuentren puras, viables y que sus características se conserven sin modificaciones y sean confiables.

Debido a que en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) existen carreras del área de Ciencias Químico Biológicas las cuales incluyen asignaturas relacionadas con la Microbiología, además de proyectos de investigación, posgrado y otras actividades similares, se hace necesario contar con un cepario que pueda cubrir las necesidades de tales actividades en lo que se refiere a disponer de microorganismos útiles para sus objetivos específicos.

A partir del desarrollo de concepto de cultivo puro propuesto por Pasteur, de la elaboración de medios de cultivo para los microorganismos y

del aprovechamiento de sus productos metabólicos con utilidad alimenticia, farmacéutica, industrial, etc., surge la necesidad de conservar los microorganismos procurando mantenerlos puros, viables y sin alteraciones de sus características fenotípicas y genotípicas, ya que una colección de cepas que cubra estos requerimientos representa un enorme potencial económico.^{12,18}

Para lograr éste propósito es necesario disponer de las cepas viables y caracterizadas para proceder a la conservación de los cultivos considerando métodos, equipo, variables como tiempo y temperatura de conservación y necesidades propias del laboratorio, y poder contar con las cepas que cubran los requerimientos de la enseñanza experimental en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y de otras instituciones externas donde sean requeridas. Aquí se encierra la importancia de las colecciones de microorganismos.¹³

En el país existen varias colecciones entre las cuales se encuentran las de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, el Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Facultad de Química, colecciones privadas de

empresas como Becton Dickinson, industrias farmacéuticas y alimenticias, etc.; además se encuentran colecciones en varias partes del mundo como la American Type Culture Collection (ATCC), la National Collection of Type Culture (NCTC), entre otras y que están interrelacionadas por organismos como la World Federation of Culture Collections y el World Data Center.

12.31

En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM los antecedentes de colecciones microbiológicas con que se cuenta son las que se han formado de manera aislada por parte de cada laboratorio, profesor y/o investigador, las cuales cubren, muchas veces de manera parcial, las necesidades de sus actividades particulares.

En éste trabajo se pretende establecer un cepario que permita cubrir en forma más amplia estas necesidades. Este proyecto se desarrolla en los laboratorios de microbiología L-513 y L-514 de docencia y el laboratorio 10 de la Sección de Ciencias de la Salud Humana ubicado en el edificio de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Campo 1) de la Universidad Nacional Autónoma de México

I. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

I.1 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

Desde la aparición del hombre sobre la tierra, los microorganismos lo han acompañado a su paso por la historia, ya sea provocando enfermedades o siendo utilizados en diversos procesos como fabricación de pan, quesos, vinos, etc., aunque de manera empírica, ya que desconocían su existencia.

Con la invención del primer microscopio por Anton Van Leeuwenhoek, los microorganismos fueron conocidos por el hombre y a partir de ahí se iniciaron varios estudios para conocer su comportamiento.

Con el progreso de la microbiología, se empezó a utilizar a los microorganismos en provecho del ser humano, aunque en esta etapa se hace con conciencia de su participación; actualmente se obtienen de ellos vacunas, antígenos, enzimas, antibióticos, ácidos nucleicos y muchos otros productos tanto en la industria alimenticia como en la farmacéutica y de producción de biológicos.^{11,17}

A partir de esto se hizo necesario contar con métodos de conservación para los microorganismos y sus productos, además de establecer colecciones de los microorganismos de interés. Desde la antigüedad se han conservado los alimentos por secado y congelación; en el siglo XVII, al desarrollarse la vacuna contra la viruela por Jenner, se hace más necesario contar con un medio para conservar éstos productos. En 1909 Camus logra sacar la vacuna al vacío y Shakesell desarrolló un método de volatilización de agua al vacío; estos métodos presentan un fenómeno que fue denominado liófilo por Reichel, Massucci y Boyer en 1930. La primera liofilizadora fue operada en 1935 por Flosford en Filadelfia.¹⁷

En 1953, el surgimiento de la biología molecular plantea una nueva perspectiva a considerar en lo referente a la conservación de las características genotípicas y en consecuencia de las fenotípicas de los microorganismos.¹⁷

I.II COLECCIONES MICROBIOLÓGICAS

Con respecto a las colecciones microbiológicas no existe un dato que indique formalmente el inicio de éstas colecciones, pero se considera que la primera perteneció a Louis Pasteur a partir del desarrollo del concepto del cultivo puro. Posteriormente éstas se promueven con la elaboración de medios de cultivo sólidos por parte de Robert Koch.^{11,17}

En 1880 Franz Kral de Checoslovaquia formó una amplia colección de bacterias y hongos que casi desaparece en la guerra y que fue dividida entre Estados Unidos y Austria.^{11,31}

En 1898, al formarse la American Society of Bacteriologists, se propone la creación de un centro de colección de microorganismos, la cual se forma en 1911 en la Natural History Museum de Nueva York y al enriquecerse con parte de la colección de Kral se establece como la American Type Culture Collection en 1925 con sede en Chicago.

Tras la recesión de 1929, la colección es trasladada a la Universidad de Georgetown en 1937 y se establece en sus propias instalaciones en 1956; finalmente se instala en su sede definitiva en Maryland en 1964.¹¹

Paralelamente se desarrollan en Suiza y Japón diversas colecciones privadas que fueron integradas a varias instituciones. En México se tiene conocimiento de la colección formada por Jeanot Stern en 1939 en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN) y a partir de ahí surgieron otras más en el Centro de Investigación Y Estudios Avanzados (CINVESTAV).^{11,31}

A partir de entonces se empiezan a formar varias colecciones por todo el mundo y con esto surge la necesidad de establecer nexos entre las mismas, surgiendo con esto la World Federation of Culture Collections (WFCC) con sede en Australia la cual se transformó posteriormente en la World Data Center ubicado en Japón.¹¹

Durante la década de los sesenta, en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, la doctora Silvia Giono da un gran impulso al cepario de esa

dependencia y dirige trabajos de tesis al respecto entre las que se encuentran las de José Luis Munguía (1974)³⁴ y Deifidia Valero (1986).⁴²

En 1992 es reconocido el cepario del CINVESTAV como el primer cepario de referencia en América Latina, lo cual es mencionado en una publicación de la misma institución donde también se describen sus antecedentes, procedimientos, actividades y perspectiva actual.³¹

CAPÍTULO 1

LA ORGANIZACIÓN DEL CEPARIO

1.1 ORGANIZACIÓN TÉCNICA

1.1.1 EL PERSONAL

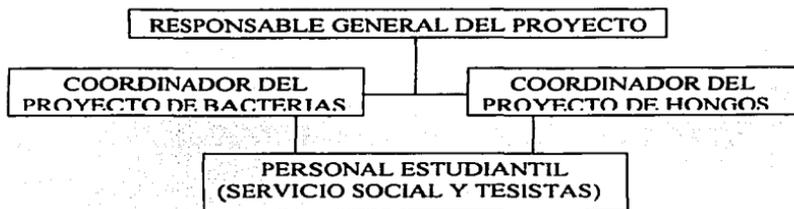
El personal que integra el cepario del área de microbiología de la Sección de Ciencias de la salud Humana está formado por una sección de docentes y otra de estudiantes cuyas funciones, responsabilidades y jerarquías están debidamente especificadas para el correcto desempeño del los propósitos del proyecto.

1.1.2 DISTRIBUCIÓN JERÁRQUICA DEL PERSONAL

Las jerarquías dentro del cepario se asignan en función de la responsabilidad que tienen en el proyecto, la categoría docente, tiempo de desempeño en el proyecto y el nivel de preparación en el caso del personal estudiantil. Lo anteriormente expuesto se ilustra en el siguiente esquema.

DIAGRAMA 1

JERARQUÍAS DEL PERSONAL DEL CEPARIO



1.1.3 FUNCIONES DEL PERSONAL

La distribución de las funciones del personal del cepario está dada de la siguiente manera:

RESPONSABLE GENERAL

Planea de manera global las actividades a realizar, los plazos de tiempo, recopila las necesidades de las labores y provee los requerimientos, concentra, evalúa e informa los resultados de las actividades.

COORDINADOR DEL PROYECTO

Organiza las actividades a realizar correspondientes al proyecto respectivo, recopila y abastece las necesidades específicas del mismo, recibe, evalúa e informa los resultados de las actividades. La World Federation of Culture Collections define a este tipo de personal como *curator* o custodio del cepario y sus actividades de la siguiente manera:

- ◊ Establece la dinámica de conservación, identificación y evaluación postconservación de las cepas.
- ◊ Elabora manuales de procedimientos.
- ◊ Establece contactos con otras colecciones.
- ◊ Se encarga de la custodia de las cepas de nuevo ingreso.
- ◊ Adiestra al nuevo personal.
- ◊ Publica catálogos de las cepas disponibles.

PERSONAL ESTUDIANTIL.

Esta categoría engloba al personal de tesis y servicio social, quienes realizan las actividades técnicas propias del cepario como son: preparación de medios de cultivo, purificación e identificación de las cepas,

esterilización del material a utilizar, conservación de las cepas, reportar los resultados de las actividades, etc.

1.2 ORGANIZACIÓN ADMINISTRATIVA

1.2.1 REGISTRO DE CEPAS

Para tener un control de las cepas disponibles, sus pruebas, su viabilidad y su identidad, éstas deben registrarse desde su ingreso, llevar un seguimiento de su procesamiento hasta llegar a su identificación plena, conservación y evaluación postconservación.

Con la finalidad de tener un control de seguridad para las cepas y contar con varias opciones de búsqueda, el archivo se integra por diversos registros que serán descritos a continuación.

1.2.2 BITÁCORAS

Libretas para el registro de las actividades realizadas durante el procesamiento de las cepas desde su ingreso hasta su identificación y conservación; a partir de aquí se vierte la información ordenada al archivo general del cepario. Éstas pueden ser de diversos tipos: de inventario, de métodos, de censo de cepas, etc. Es conveniente llevar las bitácoras de libretas cuadrículadas, foliadas y de costura para el registro.

1.2.3 ARCHIVO DEL CEPARIO.

Para facilitar el manejo de la información contenida dentro del archivo del cepario, éste se divide e integra por varios registros auxiliares integrados por hojas y tarjetas, las cuales son de diversos tipos y cuyas características son las siguientes:

A) TARJETA ALFABÉTICA

Consiste en un listado que presenta la información de las cepas ordenadas alfabéticamente de acuerdo a los siguientes criterios:

- a) De acuerdo al tipo de microorganismo se dividen en bacterias y hongos.
- b) Las bacterias se subdividen de acuerdo a su morfología y tinción en cocos Gram positivos, bacilos Gram positivos, cocos Gram negativos, bacilos Gram negativos, bacilos ácidos alcohol resistentes, y bacilos filamentosos. En el caso de los hongos éstos se dividen en levaduras, hongos filamentosos, hongos dimórficos y hongos bifásicos en base a su morfología.
- c) Se ordenan alfabéticamente de acuerdo al género y especie.

B) TARJETA NUMÉRICA.

Presenta la información de las cepas agrupándolas de acuerdo a sus características, identificándolas por medio de un sistema de numeración arábica compuesta por una serie de dígitos, cada uno de los cuales señala una característica específica del microorganismo, los cuales se leen de izquierda a derecha de la siguiente manera:

- a) El primer dígito indica si se trata de una bacteria o un hongo; designándose el número 1 para bacterias y el número 2 para hongos.
- b) El segundo dígito indica su morfología y características tintoriales.
- c) El tercero y cuarto dígitos especifican el género.

- d) Los dígitos quinto y sexto señalan la especie.
- e) El último dígito indica serotipos, biotipos, etc.

Este sistema es el que identifica a los tubos y/o viales que contienen las cepas, constituyen un método de protección de identidad de las mismas y es útil para procesar la información en una computadora.

C) HOJA DE TRABAJO

Consiste en un registro detallado de las características de identificación de las cepas durante la rutina de trabajo; contiene información del nombre y el código numérico, los medios de cultivo utilizados para su recuperación, purificación, identificación, así como las pruebas bioquímicas y especiales que se realizan, características de tinción, tiempos y temperaturas de incubación y otras condiciones de crecimiento como aerobiosis, nutrición, etc.

Un ejemplo de las hojas de trabajo se presenta a continuación:

ESQUEMA 1

HOJA DE TRABAJO BACTERIAS

CARACTERÍSTICAS DE IDENTIFICACION

Cultivo (No. o ssp.):

Fecha:

CARACTERÍSTICAS EN MEDIO SÓLIDO

Medio de cultivo:

Temperatura:

Tiempo:

Forma:

Elevación:

Color:

CARACTERÍSTICAS EN MEDIO LÍQUIDO

Medio de cultivo:

Temperatura:

Tiempo:

Turbidez:

Sedimento:

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA

Forma:

Gram:

Capsula:

Esporas:

Flagelos:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HOJA DE TRABAJO BACTERIAS (continuación)

CARACTERISTICAS DE CRECIMIENTO		
Temperatura:		
Requerimiento de oxígeno:		
Crecimiento en medios selectivos/diferenciales		
MacConkey	Eosina Azul	
Salmonella Shigella	de Metileno	
Sales manitol	Otros	
Tolerancia a NaCl		
4.5%	10.0%	
7.0%	18.0%	
Resistencia a temperatura		
4°C	15°C	42°C
CARACTERÍSTICAS BIOQUIMICAS		
Enzimas respiratorias		
Catalasa	Oxidasa	
Metabolismo de carbohidratos		
OF	Hidr. almidón	
VP	Hidr. esculina	
MR	Leche tomasol	
Citratos	ONPG	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HOJA DE TRABAJO BACTERIAS (continuación)

Producción de ácidos de:

Arabinosa:

Glucosa:

Manitol:

Xilosa:

METABOLISMO DE COMPUESTOS

NITROGENADOS

Nitratos:

Indol:

Fenilalanina:

Arginina:

Ornitina:

Urea:

Tween 80:

OTRAS

TSI:

Superficie/ fondo:

Glucosa:

Sacarosa:

Lactosa:

Gas:

Gas:

Ác. sulfhídrico:

SIM

Indol.

Motilidad.

Ác. sulfhídrico

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

HOJA DE TRABAJO HONGOS

CARACTERÍSTICAS DE IDENTIFICACIÓN

Cultivo (No. O ssp):

Fecha:

CARACTERÍSTICAS COLONIALES

Medio de cultivo:

Forma:

Color:

Pigmentación:

MORFOLOGÍA MICROSCOPICA

Forma:

Tinción:

Cápsula:

Micelio:

Pigmentación:

Estructura de reproducción asexual:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HOJA DE TRABAJO HONGOS (continuación)

CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO

Temperatura:

Tiempo:

Crecimiento en medios selectivos y/o especiales:

Sabouraud con aceite

Biggy

Medios de Prueba

Niger

Para Dermatofitos

Otros.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Carbohidrato

Asimilación

Fermentación

Glucosa:

Sacarosa:

Galactosa:

Maltosa:

Trealosa:

Lactosa:

Resistencia al pH:

Hidrólisis de urea:

D) HOJA MAESTRA

Consiste en un registro que integra o recopila información completa y detallada de cada cepa contenida e la hoja de trabajo, abarca desde el ingreso de la cepa, su procedencia, presunta identidad, personal que recibe, procesa e identifica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A continuación se presente un ejemplo de la hoja maestra:

ESQUEMA 2
HOJA MAESTRA

IDENTIFICACIÓN	
Género y especie:	No:
Origen:	
Aislado por:	
Recibido por:	para:
Registrado por:	fecha:
Confirmado por:	fecha:
Fecha de ingreso:	
Fecha de conservación:	
Fecha de reactivación:	
Método de conservación:	
Existencia:	
Características:	
Referencias literarias:	

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

HOJA MAESTRA (continuación)

MORFOLOGÍA COLONIAL

Medio: temp:
Forma:
Tamaño:
Bordes:
Superficie:
Agrupación:
Características:

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA

Gram: Cápsula: T. ácida:
Tinción:
Motilidad:
Esporas:
Forma:
Pared:
Otras Estructuras:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HOJA MAESTRA (continuación)

ANEXO BACTERIAS

MEDIOS DE CULTIVO

Agar:
MacConkey.
Sangre telurito:
Agar Sangre:
Otro:

Caldo:
BHI:
Casoy:
Nutritivo:
Otro:

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Catalasa:	Linasa:
Oxidasa:	Arginina:
OF:	Omitina:
Nitratos:	KCN:
MR:	Indol.
VP:	Ác. sulfhídrico:
Malonatos:	TSI:
Citratos:	KIA:
Urea:	
Esculina:	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO HONGOS

MEDIOS DE CULTIVO

Sabouraud:	Niger:
Biggy:	Micosel:
Dermatofitos:	Selec. Candida:

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS

Arabinosa:
Celobiosa:
Dextrosa:
Galactosa:
Glicerol:
Inositol:
Lactosa:
Maltosa:
Manitol:
Sorbitol:
Sucrosa:
Trealosa:
Xilosa:
Adonitol:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO HONGOS

TINCIONES

Gram:

Azul de algodón:

Tinta china:

Otras:

ESTRUCTURAS MICÓTICAS

Tamaño:

Forma:

Micelio:

Color:

Grosor:

Diámetro:

Segmentación:

Estructuras de reproducción asexual:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

E) SOLICITUD DE CEPAS

Para poder brindar el servicio de provisión de cepas, los usuarios deberán llenar una solicitud como la que se muestra a continuación:

ESQUEMA 3

SOLICITUD DE CEPAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN SECCIÓN CIENCIAS DE LA SALUD HUMANA CEPARIO MICROBIOLÓGICO	
Solicitud No. _____	
SOLICITUD AL CEPARIO	
Nombre del solicitante _____	Dependencia _____
Fecha de solicitud _____	Área _____
Fecha de utilización _____	Asignatura _____
DESCRIPCIÓN DE LA CEPA	SE ENTREGARÁ EN:
Familia _____	tubo caja Petri vial
Género _____	medio de cultivo o condiciones de conservación: _____
Especie: _____	
Indicaciones especiales: _____	
Comentarios: _____	
Fecha de entrega: _____	
Firma de Recibido: _____	
Nota: Se usará una solicitud por cepa.	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2.4 REGLAMENTO

Para tener un adecuado control en los movimientos de las cepas, los procedimientos de solicitud y entrega de las mismas se rigen por el siguiente reglamento:

REGLAMENTO DEL CEPARIO

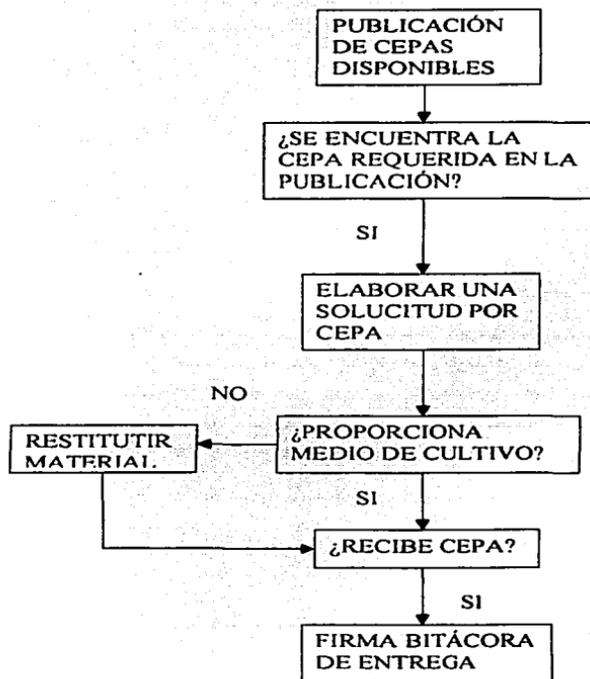
1. Se publicará una lista con las cepas disponibles en el cepario.
2. Sólo se asegurará la entrega de cepas que se encuentren registradas en la lista.
3. Para solicitar una cepa se hará por escrito llenando la solicitud correspondiente.
4. Se deberá llenar una solicitud por cepa.
5. Sólo se atenderá y se dará prioridad a las solicitudes que tengan 15 días de anticipación a la fecha de utilización.
6. Al solicitar la cepa se deberá proporcionar el medio de cultivo en el que se desca recibirla, o en su defecto deberá especificar el medio de cultivo y restituir el material al momento de recibirla.

7. Al recoger la cepa se deberá presentar copia de la solicitud y firma de recibido en la bitácora de entrega de cepas.
8. No deberán tomarse cepas directamente del cepario.

Con la finalidad de presentar el proceso de solicitud de una cepa de manera ilustrativa, se muestra un diagrama de procedimiento.

DIAGRAMA 2

PROCESO DE SOLICITUD AL CEPARIO DE LA FESC



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 2

BACTERIAS

Las bacterias son organismos procariontes unicelulares, la mayoría son de vida libre y se reproducen asexualmente por fisión binaria, poseen un cromosoma circular único de doble cadena de ADN que se replica de forma no mitótica, algunos cuentan con un fragmento pequeño de ADN conocido como plásmido, No tiene núcleo, retículo endoplásmico, mitocondrias, etc., sus ribosomas se encuentran dispersos por el citoplasma. Entre los organelos que pueden presentar existen flagelos cuya función es la locomoción y microfibrillas o fimbrias que funcionan como mecanismos de adhesión y transmisores de material genético.⁴⁴

La identificación bacteriana en el laboratorio se rige por criterios morfológicos, metabólicos, tintoriales, bioquímicos, etc., lo cual genera diversas categorías por cada característica.⁴⁴

Bajo esta perspectiva se puede describir a las bacterias por su morfología como cocos (esferas), bacilos (bastones), espiroquetas (espirales), etc., por su agrupación se conocen como pares, cadenas, racimos, filamentos, por su cantidad de glucopéptidos y lípidos en pared y su resistencia a la decoloración se denominan Gram positivos (morados), Gram negativos (rojizos) y ácidosresistentes (no decolorables por ácido).⁴⁴

Por su tolerancia al oxígeno se conocen como aerobias, anaerobias, aerotolerantes. Otros criterios incluyen la utilización de diversos nutrientes del medio como proteínas y carbohidratos, los productos del metabolismo de los mismos, la resistencia a variantes de temperatura, pH, presencia de antibióticos y morfología colonial en distintos medios de cultivo.⁴⁴

Por sus características propias las bacterias presentan problemas par su clasificación taxonómica debido a los constantes descubrimientos de nuevas propiedades, y la carencia de antecesores evolutivos por variación y diversificación de los mismos. La taxonomía bacteriana en la actualidad se basa en los lineamientos establecidos por la 8ª. Edición del Manual Bergey

de Bacteriología Determinativa, del cual un ejemplo se presenta a continuación:⁵

REINO	DIVISIÓN	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO
<i>Procaryotae</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Eubacteriales</i>	<i>Pseudomonadeaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>
			<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>
			<i>Brucellaceae</i>	<i>Haemophilus</i>
			<i>Micrococaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>
			<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Streptococcus</i>
			<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
			<i>Bacillaceae</i>	<i>Clostridium</i>
		<i>Actinomycetales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>
			<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.1 COCOS GRAM POSITIVOS

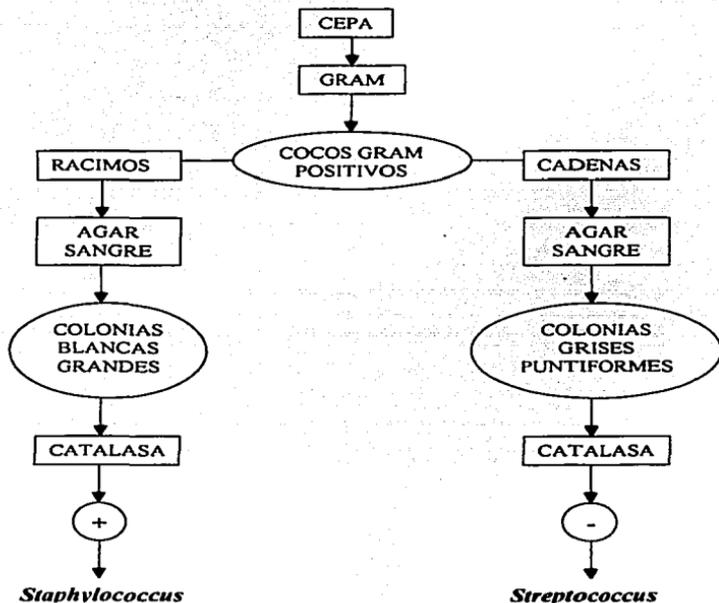
Los cocos Gram positivos son células esféricas y ovoides, anaerobios facultativos entre los cuales se encuentran los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*, el género *Staphylococcus* tiene un metabolismo respiratorio que le confiere la propiedad de ser catalasa positivo, además de un metabolismo fermentativo; en cambio el género *Streptococcus* solo posee metabolismo fermentativo por lo que es catalasa negativo. Algunas especies tienen requerimientos nutricionales complejos.^{8,27,44}

Éstos organismos tienen una alta concentración de glucopéptidos y baja concentración de lípidos en su pared, por lo que retienen el colorante cristal violeta y se tiñen de color azul morado.^{8,27,44}

La diferenciación de dos de los principales géneros de los cocos Gram positivos se esquematiza en el siguiente diagrama.

DIAGRAMA 3

DIFERENCIACIÓN DE COCOS GRAM POSITIVOS ^{16,22}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.1.1 *Staphylococcus*

Son cocos Gram positivos, de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, son inmóviles, anaerobios facultativos, catalasa positivos, crecen en presencia de cloruro de sodio al 7.5% y a temperaturas de 18°C a 40°C. En agar sangre forman colonias grandes, blancas, opacas, cupulares, lisas y cremosas. *S. aureus* tiene un color amarillento.^{3,22}

S. aureus produce una gran cantidad de productos extracelulares entre los que destacan hemolisinas y coagulasa; las hemolisinas le dan la propiedad de producir β hemólisis en agar sangre, la coagulasa le confiere una característica específica de diferenciación de las otras especies al poder coagular plasma *in vitro*.^{2,8,16,44}

También tiene la capacidad de fermentar el manitol y adquirir una coloración amarilla al sembrarse en agar sales manitol.^{2,8}

Otras especies importantes de género son: *S. saprophyticus*, el cual resiste también las altas concentraciones de cloruro de sodio pero no

fermenta al manitol, produce α hemólisis, es coagulasa negativo, es resistente a novobiocina y es incapaz de reducir nitratos.^{3,8,16,22,44}

S. epidermidis muestra la misma reacción que *S. saprophyticus* en agar sales manitol, su hemólisis es igualmente de tipo α , es también coagulasa negativo, es sensible a novobiocina e hidroliza la urea.^{3,8,16,22,44}

Las características de identificación de éstas especies se pueden observar en la tabla 1 y el diagrama 3A.

DIAGRAMA 3A

IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus* ²²

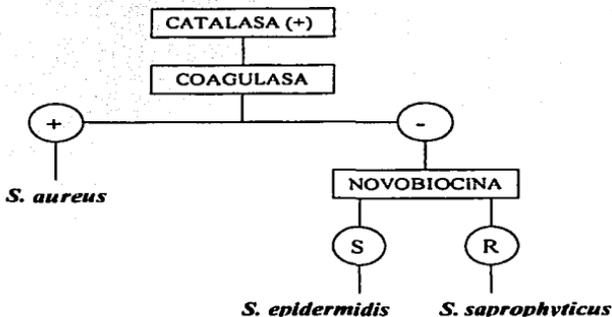


TABLA I

IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus* ²²

	Novobiocina	Urea	Nitratos	Manitol	Coagulasa
<i>S. aureus</i>	S	/	/	+	+
<i>S. epidermidis</i>	S	+	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	R	-	-	-	-

S= Sensible

R= Resistente

/= No realizada

IMPRESO CON
FALLA DE ORIGEN

2.1.1 *Streptococcus*

Son cocos Gram positivos, catalasa negativos, se agrupan en cadenas o pares, son inmóviles, no esporulados, anaerobios facultativos con metabolismo fermentativo, crecen a 37°C. ^{6,8,16,22,44}

Son células ovales o esféricas de 0.5 a 1.0 μm de diámetro, forman cadenas largas al sembrarse en medio líquido y presentan sedimento en el fondo del tubo, producen hemólisis de tipo α , β o γ . Algunas especies tienen requerimientos más exigentes como atmósfera anaerobia con nitrógeno. Crecen en agar sangre formando colonias pequeñas puntiformes grises y opacas. ^{3,8,16,22,44}

Lancefield establece una clasificación para el género basándose en su composición de carbohidrato C de la pared celular, designando grupos dentro de los cuales ubica a las especies, tales grupos se caracterizan por serología. Las especies que pertenecen a algunos de estos grupos pueden identificarse por medio de las pruebas que se muestran en la tabla 2 y el

diagrama 3B. A continuación se muestra un ejemplo de especies agrupadas de acuerdo a Lancefield: ⁴⁴

Grupo A: *S. pyogenes*

Grupo B: *S. agalactiae*

Grupo C: *S. equisimilis*, *S. equi*, *S. dysgalactiae*

Grupo D: *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. durans* (enterococos); *S. bovis*,
S. equinus (no enterococos)

Grupo F: *S. anginosus*

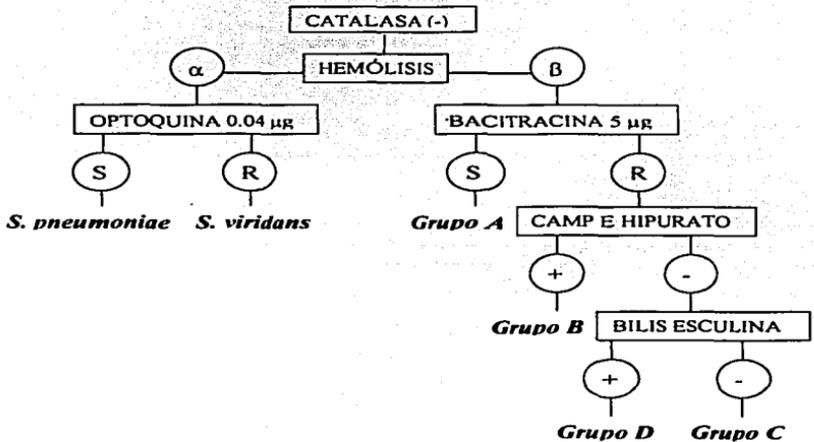
Grupo H: *S. sanguis*

Grupo K: *S. salivarius*

La prueba de diferenciación característica de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* es la catalasa y el proceso se señala en el diagrama 3.

DIAGRAMA 3B

IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus*²²



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 2
IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus*²²

Grupo	Hemólisis	Bacitracin a 0.04 µg	Optoquin a 5 µg	Hidrólisis hipurato	CAMP	Bilis esculina	NaCl 6.5%	Sol. bilis
A	β	+	-	-	-	-	-	-
B	β	-	-	+	+	-	-	-
C	β	-	-	-	-	-	-	-
D	α o β	-	-	-	-	+	+	-
Pn	α	-	+	-	-	-	-	+

Nota: Pn = *Streptococcus pneumoniae* Sol. = solubilidad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.2 BACILOS GRAM POSITIVOS NO ESPORULADOS

Son microorganismos pleomórficos, suelen tener forma de bacilos cortos ligeramente curvos, de metabolismo respiratorio y por lo mismo catalasa positivos, con excepción de algunas especies.⁴⁴

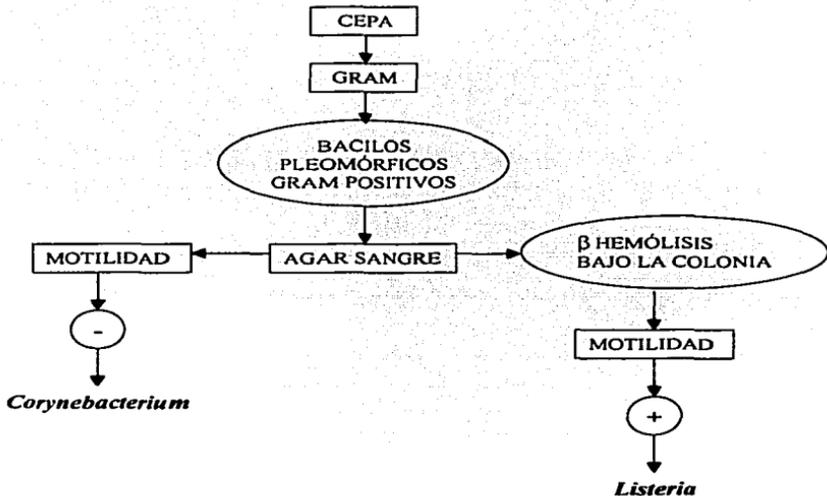
A excepción del género *Corynebacterium*, el cual es inmóvil, los demás miembros de este grupo son móviles a 25°C e inmóviles a 35°C; suelen agruparse en pares, cadenas o empalizadas.^{8,44}

Puede ser aerobios o anaerobios facultativos, no son ácidosresistentes, excepto por el *Corynebacterium* el cual posee cierta resistencia parcial por la presencia de un bajo porcentaje de ácido micólicos en su pared.^{8,27,44}

En el siguiente diagrama se sintetiza la manera de diferenciar los géneros *Corynebacterium* y *Listeria*, pertenecientes a éste grupo.

DIAGRAMA 4

DIFERENCIACIÓN DE BACILOS GRAM POSITIVOS NO
ESPORULADOS ^{16,22,44}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.2.1 *Corynebacterium*

Bacilos pleomórficos, rectos o ligeramente curvos, no esporulados, Gram positivos, oxidasa negativos, no ácido-alcohol resistentes. Son aerobios o anaerobios facultativos, catalasa positivos, son inmóviles, tienden a agruparse en empalizadas o lo que se llama "letras chinas".^{16,22,44}

Si se tiñen algunas especies con azul de metileno, se observa la presencia de gránulos de polimetafostato conocidos como gránulos metacromáticos.^{3,8,16,22,44}

La especie principal es *C. diphtheriae*; crece en agar sangre de forma semejante al género *Streptococcus*, en agar Löfller forma pequeñas colonias blancogrisáceas y en agar sangre con telurito de potasio al 0.04% dando colonias de color gris-negro con tres tipos colonial: *gravis*, *mitis*, *intermedius*; producen ácido de glucosa y maltosa, se desarrollan a 37°C, no hidroliza urea y gelatina.^{3,16,22,44}

El proceso de diferenciación de las especies del género *Corynebacterium* se detalla en la tabla 3 y en el diagrama 4A.

DIAGRAMA 4A
IDENTIFICACIÓN DE *Corynebacterium*⁴⁴



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 3
IDENTIFICACIÓN DE *Corynebacterium* ⁴⁴

	Hemólisis	Fer. Sacarosa	Nitratos	Urea	Gránulos Metacromáticos
<i>C. diphtheriae</i>	+	-	+	-	+
<i>C. pseudodiphthericum</i>	-	-	+	+	-
<i>C. xerosis</i>	-	+	+	-	-
<i>C. pseudotuberculosis</i> *	+	V	V	V	+
<i>C. verale</i>	-	-	-	+	-
<i>C. kutscheri</i>	-	+	-	+	-
<i>C. equis</i>	-	-	+	-	-
<i>C. bovis</i>	-	-	-	+	-

**C. ovis* v = variable

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.2.2 *Listeria*

Son bacilos pleomórficos no esporulados, miden de 0.4 a 0.5 por 0.5 a 2 μm , Gram positivos. *L. monocytogenes* es móvil a 25°C por la presencia de flagelos peritricos y a 37°C por un flagelo polar, es catalasa positivo.
8,16,22,44

Su morfología colonial es semejante a *Streptococcus*, forma colonias pequeñas, grises y traslúcidas.⁴⁴

Produce hemólisis β en agar sangre bajo las colonias en su variedad clínica y presenta un sinergismo hemolítico con las hemolisinas β de *S. aureus* dando una reacción de Christie, Atkins, Munch-Peterson (CAMP) semejante a la observada en el género *Streptococcus*.^{16,22,44}

Esta bacteria es microaerofílica y su crecimiento incrementa al incubarla a 10% de dióxido de carbono y baja concentración de oxígeno, su temperatura de desarrollo está entre 4°C y 35°C.^{3,8,16,22,44}

La identificación de las especies de éste género se detalla en el cuadro 4 y en diagrama 4B.

DIAGRAMA 4B

IDENTIFICACIÓN DE *Listeria*⁴⁴

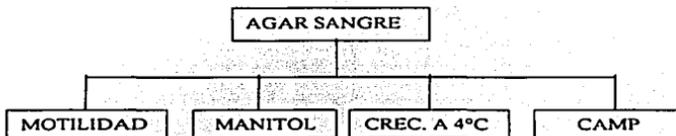


TABLA 3

IDENTIFICACIÓN DE *Listeria*⁴⁴

	β Hemólisis	Manitol	Motilidad a 25°C	CAMP
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	-	+	-	-
<i>L. soyi</i>	-	+	-	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3 BACILOS GRAM POSITIVOS ESPORULADOS

Son bacilos Gram positivos, no ácidosresistente, flagelados en su mayoría, dependiendo del género pueden ser aerobios o anaerobios estrictos. ⁸

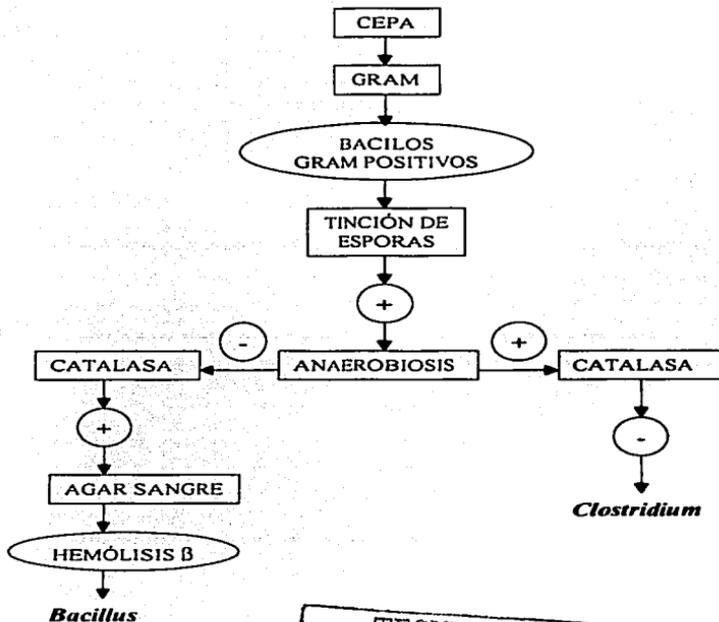
Una característica importante en estas bacterias es la capacidad de formar endosporas como formas de resistencia contra condiciones agresivas tales como falta de nutrientes, temperatura elevada, presencia de oxígeno en el caso de anaerobios estrictos, etc. ^{8,44}

Las esporas así como las endotoxinas producidas por algunas especies son liberadas al exterior por lisis celular, las esporas protegen el material genético de agresiones como las ya descritas y las endotoxinas funcionan como mecanismos de patogenicidad. ^{16,44}

Los anaerobios tienen también otro mecanismo de patogenicidad que consiste en la producción de enzimas proteolíticas cuya función principal es conferirles capacidad invasiva. ^{8,16,27,44}

En el siguiente diagrama se muestra la diferenciación de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*.

DIAGRAMA 5
DIFERENCIACIÓN DE BACILOS GRAM POSITIVOS
ESPORULADOS ^{16,22,44}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3.1 *Bacillus*

Este género se agrupa solo en cadenas, es móvil, catalasa positivo, excepto *B. anthracis* y *B. cereus*; son bacilos largos Gram positivos, miden entre 0.5-1.2 por 2.5-10 μm ; crecen en agar sangre e infusión cerebro corazón formando colonias planas, irregulares de borde ondulado, presentan endosporas cilíndricas o helicoidales en posición central, se encuentran esporas en tierra y agua, *B. anthracis*, *B. subtilis* y otros forman cápsula de ácido poliglutámico.^{16,22,44}

B. subtilis es la cepa que se usa como modelo para establecer las características del género debido al patrón regular que presenta en sus pruebas de identificación, las cuales no muestran ninguna prueba con resultado variable ni crecimiento anaerobio como algunas otras especies del mismo género.^{16,44}

B. stearothermophilus es usado como control biológico de métodos de esterilización en calor húmedo a 121°C por la resistencia de sus esporas.

Este bacilo es aerobio, esto lo distingue de anaerobios como *Clostridium*, además de la prueba de catalasa (diagrama 5) ^{16,22,44}

Las pruebas que diferencian las especies del género se detallan en el diagrama 5A y la tabla 5.

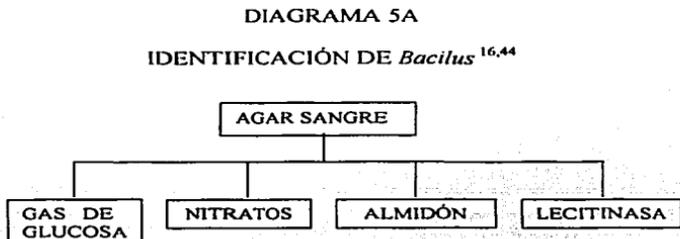


TABLA 5
IDENTIFICACIÓN DE *Bacillus* ^{16,44}

	Anaerobiosis	Gas de glucosa	Lecitinasa	Hidrólisis almidón	Nitratos	VP
<i>B. anthracis</i>	+	-	+	+	+	+
<i>B. cereus</i>	+	-	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	+	+
<i>B. brevis</i>	-	-	-	+	d	-

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

2.3.2 *Clostridium*

Bacilos anaerobios estrictos aunque algunas especies son aerotolerantes, móviles con flagelos peritricos, Gram positivos y esporulados, catalasa negativos, se encuentran solos, en pares o cadenas, miden entre 0.3-1.6 por 1-14 μm .^{16,22,27,44}

Su morfología colonial en agar sangre es circular, lisa, grande, elevada con bordes enteros o filamentosos, las cepas móviles producen el fenómeno de swarming, en el cual las colonias se expanden por todo el agar perdiendo su forma y bordes.^{27,44}

Su hábitat es ambiental, se encuentran esporas en la tierra y en el aparato digestivo del hombre y animales; producen hemolisina y tienen propiedades sacarolíticas y proteolíticas.^{8,16,27,44}

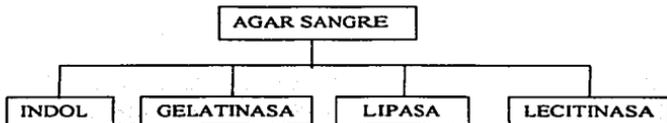
Fermentan polioles, azúcares y aminoácidos, ácidos orgánicos, purinas y otros compuestos orgánicos. Su función en la naturaleza es la degradación de materia orgánica en ácidos, alcoholes, bióxido de carbono, hidrógeno y minerales.^{16,44}

Los requerimientos atmosféricos son variables de acuerdo a las especies, algunas requieren 100% de CO₂, otras requieren 90% de nitrógeno y 10% de CO₂, y otras 100% de nitrógeno. Los métodos de anaerobios usados comúnmente en el laboratorio son el de generación de CO₂ por medio de una tableta efervescente en agua y el consumo de O₂ por medio de una vela encendida en un contenedor hermético, el sistema comercial GasPak que utiliza perlas de paladio como catalizador reductor de O₂ a H₂O y sobres generadores de H₂, N₂ y CO₂ en un contenedor hermético especialmente diseñado para el sistema.^{8,16,22,27,44}

Sus características diferenciales de especies se observan en la tabla 6 y el diagrama 5B.

DIAGRAMA 5B

IDENTIFICACIÓN DE Clostridium^{16,44}



TECNOLOGÍA
FALLA DE ORIGEN

TABLA 6
IDENTIFICACIÓN DE *Clostridium*^{16,44}

	Lecitinasa	Lipasa	Gelatinasa	Índol
<i>C. perfringens</i>	+	-	+	-
<i>C. tetani</i>	-	-	+	v
<i>C. botulinum</i>	-	+	+	-
<i>C. novii</i>	+	v	+	v

v = variable

TE. ...
FALLA DE ORIGEN

2.4 BACTERIAS GRAM NEGATIVAS ENTÉRICAS

Bacterias Gram negativas del tracto gastrointestinal, bacilos no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos, resistentes a sales biliares. Forman colonias lisas convexas; muchas cepas son comensales, otra son patógenas. ^{9,16,22,27,44}

Su principal forma de identificación es realizando pruebas bioquímicas secundarias donde se observa su reacción ante diferentes metabolitos; éste sistema muchas veces sólo permite conocer el género y muy pocas especies, las cepas bacilares Gram negativas, catalasa positivas, oxidasa negativas y reductores de nitratos pertenecen a esta familia. ^{16,22,27,44}

Debido a que su clasificación es compleja, se han tenido que agrupar en tribus de acuerdo a las características de los géneros; además recientemente se han logrado clasificaciones más precisas y complejas basándose en sus características patogénicas, de resistencia, genéticas, etc. ^{16,22,27,44}

La observación de su morfología colonial en los distintos medios selectivos y diferenciales nos ayudan a tener un criterio importante acerca de la identidad de las enterobacterias.

A continuación se muestra una tabla que presenta algunas características en estos medios.

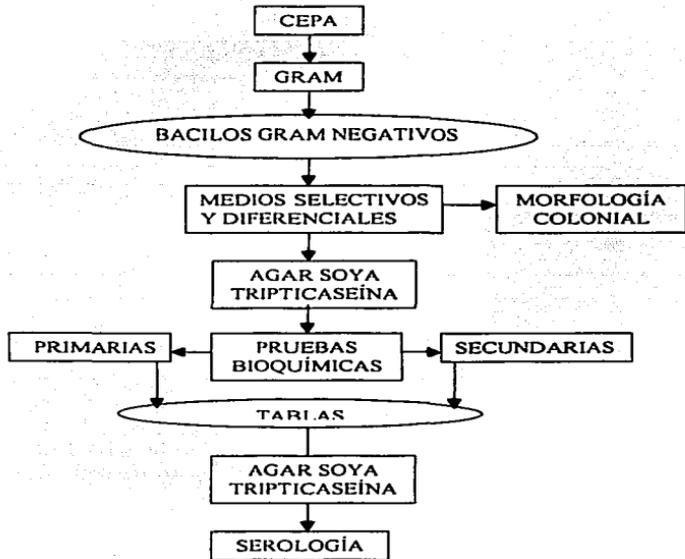
TABLA 7
 MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES PARA
 ENTEROBACTERIAS²⁷

Medio de cultivo	Componentes	Reacción e interpretación
Agar MacConkey (MC)	Lactosa, sales biliares, rojo neutro, cristal violeta	<i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , y <i>Enterobacter</i> (lactosa +) forman colonias rojas. <i>Citrobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Providencia</i> y <i>Hafnia</i> (lactosa débiles) son incoloras o ligeramente rosadas. <i>Proteus</i> , <i>Edwardsiella</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> son incoloras o transparentes.
Agar eosina azul de metileno (EMB)	Lactosa, eosina, azul de metileno.	<i>E. coli</i> produce colonias verde metálico. <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> y <i>Hafnia</i> forman colonias violetas (lactosa +). <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> forman colonias transparentes (lactosa -). <i>Y. enterocolitica</i> es transparente en la fórmula clásica y violeta-negro en la fórmula con sacarosa.
Agar desoxicolato citrato (DC)	Lactosa, desoxicolato de sodio, citrato de sodio, citrato férrico, rojo neutro.	<i>E. coli</i> produce colonias pequeñas rojas, <i>Klebsiella</i> y <i>Enterobacter</i> forman colonias mucoides incoloras con centro rosa (lactosa +). <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> forman colonias grises incoloras (lactosa-).
Agar Salmonella-Shigella (SS)	Lactosa, sales biliares, citrato de sodio, citrato férrico, tiosulfato de sodio, rojo neutro, verde brillante.	Color rojo por cepas lactosa +, <i>Salmonella</i> gpo. Arizona semeja a <i>E. coli</i> . <i>Salmonella</i> forma colonias incoloras con centro negro, <i>Shigella</i> no muestra ennegrecimiento. Las cepas móviles de <i>Proteus</i> no invaden el agar.
Agar xilosa linasa desocilato. (XLD)	Xilosa, linasa, lactosa, sacarosa, extracto de levadura, rojo de fenol, desoxicolato de sodio, tiosulfato de sodio, citrato amónico férrico.	<i>E. coli</i> y algunas especie de <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Proteus</i> forman colonias amarillas, <i>Citrobacter</i> puede presentar centro negro. <i>Salmonella</i> y <i>Arizona</i> forman colonias rojas con centro negro. <i>Shigella</i> , <i>Providencia</i> y algunos <i>Proteus</i> forman colonias traslúcidas.
Agar sulfito bismuto (SB)	Glucosa, sulfato ferroso, sulfito de bismuto, verde brillante.	<i>Shigella</i> y lactosa + son inhibidos. <i>S. typhi</i> son negras brillantes. <i>S. enteritidis</i> no tienen brillo, <i>S. gallinarum</i> , <i>choleraesuis</i> y <i>paratyphi</i> son verdosas.

TE CON
 FALLA DE ORIGEN

Este grupo abarca una gran variedad de géneros y especies, por lo cual se manejan en el presente trabajo de manera conjunta, en vez de tratar cada género, además de que sus métodos de identificación son comunes a todos ellos (diagrama 6).

DIAGRAMA 6
IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS ^{16,22,27,44}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las pruebas bioquímicas secundarias y la serología son determinantes para la identificación de éstas bacterias; a continuación se muestran las pruebas y los resultados correspondientes a cada género, incluyendo algunas especies (tabla 8).

TABLA 8
PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
ENTEROBACTERIAS²⁷

BACTERIA	IND	MR	VP	CIT	H ₂ S	UR	LIS	ORN	MAL
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-	V	V	-
<i>Shigella</i>	V	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	+	+	V	-	V	V
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	V	+	+	-	+	+	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	V	+	+	-	+	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	V
<i>Serratia</i>	-	V	+	+	-	V	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	V	V	+	V	-	+	-

Abreviaturas: IND= indol, MR= rojo de metilo, VP= Voges Proskauer, CIT= citratos, H₂S= ácido sulfhídrico, UR= urea, LIS= lisina, ORN= ornitina, MAL= malonatos, V= variable.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5 BACTERIAS GRAM NEGATIVAS NO ENTÉRICAS

Son bacterias pleomórficas, comúnmente bacilares rectas o curvas, variando en función del género o la especie, pueden ser aerobios o anaerobios facultativos con metabolismo oxidativo, algunas especies pueden ser fermentadoras. ^{8,16,27,44}

Suelen desarrollar lentamente en agar sangre o chocolate y muy pocas especies crecen en agar MacConkey; pueden requerir de CO₂ como *Haemophilus*, pH alcalino como Vidrio, factores hemínicos como en *Actinobacillus* y *Haemophilus*, temperaturas distintas a la corporal como *Pasteurella*, medios de cultivo específicos como *Bordetella*, y otras condiciones de crecimiento. ^{8,16,27,44}

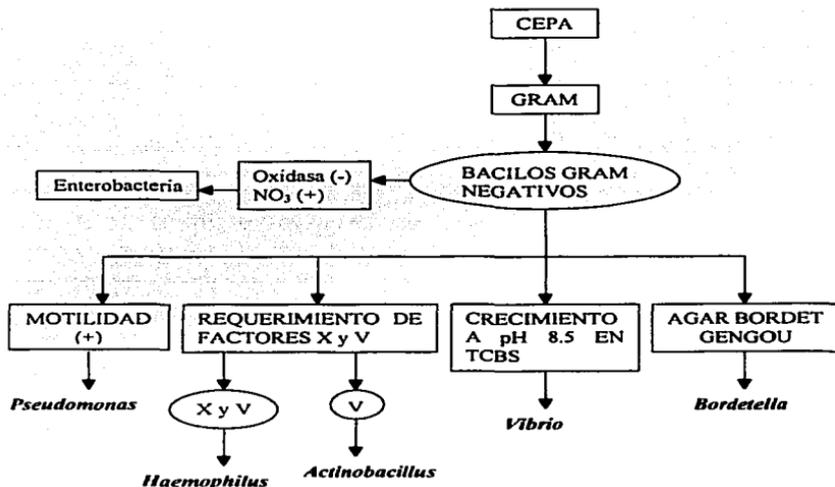
Una excepción en este grupo es el género *Pseudomonas*, el cual es no fermentador, tiene metabolismo respiratorio, es de crecimiento rápido y poco exigente nutricionalmente, además puede desarrollar bien en agar MacConkey. ^{16,22,44}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La diferenciación de algunos géneros agrupados en esta categoría se muestra en el diagrama siguiente:

DIAGRAMA 7

DIFERENCIACIÓN DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS NO ENTÉRICAS ^{16,22,44}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5.1 *Pseudomonas*

Género que agrupa a un gran número de bacilos Gram negativos no fermentadores de carbohidratos y de hábitat ambiental, móviles por flagelos polares, aerobios estrictos, son capaces de usar compuestos simples de carbono orgánico e inorgánico como fuente de energía; son catalasa y oxidasa positivos, crecen entre 4°C y 43°C (tabla 9 y diagrama 7A).^{16,22,44}

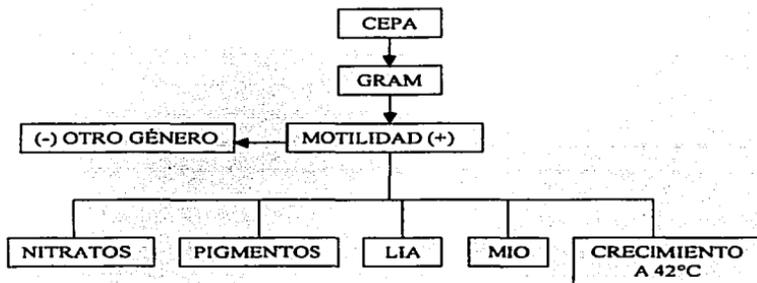
Algunos de éstos bacilos tienen la característica de producir pigmentos en medios de cultivo; un medio selectivo para éste género es el agar Pseudocel, el cual contiene el detergente cetrimida (bromuro de hexadecil trimetil amonio) para favorecer la producción de pigmentos (diagrama7).^{16,44}

Los pigmentos producidos por especies de éste género son la piocianina, que se observa en el medio de cultivo de color azul verdoso y la fluoresceína o pioverdina, la cual se observa de color amarillo verdoso con lámpara de Wood.^{16,27}

Además de sus pruebas bioquímicas, puede identificarse por su morfología colonial irregular, con producción de pigmentos, β hemolíticas y su olor característico a tortilla mojada. ^{16,44}

Son bacilos no esporulados, resistentes a la desinfección química y a varios antibióticos. El espécimen tipo es *P. aeruginosa*. ⁴⁴

DIAGRAMA 7A
IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomonas* ^{16,22,44}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 9
IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomonas* ^{17,22,44}

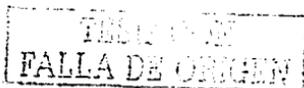
	Nitratos	pigmentos	LIA	MIO	Crec. a 42°C
<i>P. aeruginosa</i>	v	p/f	-	-	+
<i>P. cepacia</i>	-	-	+	V	v
<i>P. mallei</i>	-	-	-	-	-
<i>P. pseudomallei</i>	+	-	-	-	+
<i>P. maltophilia</i>	-	-	+	-	v
<i>P. fluorescens</i>	-	f	-	-	-

v.= variable; p= pirocianina; f= fluoresceína

2.5.2 *Bordetella*

Cocobacilo Gram negativo que mide entre 0.2 a 0.3 por 0.5 a 1 μm , se puede observar solo o en pares, crece a temperatura de 35-37°C, catalasa positivo, produce idol. ^{16,22,44}

La especie representativa es *B. pertussis*, que es oxidasa positivo y de la cual se produce una bacterina con fines inmunogenicos. ^{16,44}



La especie *B. bronchiseptica* es notoriamente menos patógena y la única cepa móvil del género. ^{16,44}

Lo más recomendable para la recuperación de éste género es el uso de agar sangre glicerol papa (Bordet-Gegou) en casos de primoaislamiento, aquí presenta colonias lisas, convexas, brillantes como gotas de mercurio con una zona de hemólisis no definida, esto la distingue de otros géneros Gram negativos no entéricos (diagrama 7). ^{16,22,27,44}

Las características de identificación de sus especies se detallan en el diagrama 7B y la tabla 10.

DIAGRAMA 7B

IDENTIFICACIÓN DE *Bordetella* ^{16,22,27,44}

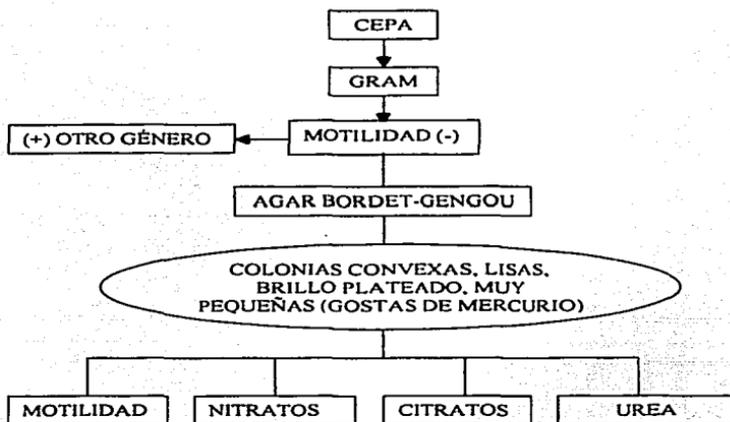


TABLA 10

IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO *Bordetella* ⁴⁴

	Motilidad	Nitratos	Citratos	Urea	Crec. Bordet-Gengou
<i>B. pertussis</i>	-	-	-	-	3-4 días
<i>B. parapertusis</i>	-	-	+	+	1-2 días
<i>B. bronchiseptica</i>	+	+	+	+	1-2 días

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5.3 *Haemophilus*

Este género está formado por bacilos Gram negativos de 0.5 a 1.5 μm , pueden presentar formas cocobacilares, filamentosas y pleomórficas, forma colonias pequeñas, puntiformes, redondas y convexas no hemolíticas.
16,44

Son inmóviles, no esporulados, los cultivos jóvenes presentan cápsula, requieren de los factores X termoestable (hemina) y V termolábil (nicotinamina adenin dinucleótido) presentes en la sangre y que se liberan en el medio al hemolizarse los eritrocitos por medio de calor como en el agar chocolate, o por la presencia de una cepa hemolítica como *S. aureus* en agar sangre, produciendo el fenómeno llamado satelitismo en el cual las colonias de *Haemophilus* crecen únicamente en torno a la colonia de la cepa hemolítica y dentro de la zona de hemólisis, esta característica hace que tales bacterias sean denominadas hemofílicas.⁴⁴

Estos requerimientos nutricionales le permiten distinguirse de los demás géneros no entéricos (diagrama 7) y la identificación de las principales especies de muestra en el diagrama 7C y la tabla 12.

DIAGRAMA 7C
IDENTIFICACIÓN DE *Haemophilus*^{16,44}

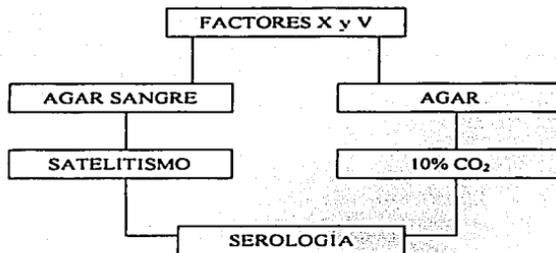


TABLA 11
IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO *Haemophilus*^{16,44}

	Requerimiento de factor V	Requerimiento de factor X	Requerimiento de CO ₂	Hemólisis
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	-
<i>H. aegyptius</i>	+	+	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	-	+
<i>H. ducreyi</i>	-	+	+	-
<i>H. parainfluenzae</i>	+	-	-	-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5.4 *Actinobacillus*

Este género está formado por unos pequeños cocobacilos Gram negativos e inmóviles que requieren de CO₂ estas características pueden llevar a confundirlo con *Haemophilus*, pero se distingue porque las colonias al incubarse por tiempo prolongado crean unos filamentos que le dan forma de estrella de mar.⁴⁴

Su crecimiento es más adecuado en agar suero o en agar sangre; requiere para su desarrollo de una atmósfera de dióxido de carbono al 10%. El crecimiento óptimo se observa al incubarlos a una temperatura de 37°C.

44

Su morfología colonial es muy característica ya que crece tras 2 o 3 días de incubación en forma de estrella de 1 mm de diámetro y con una gran adherencia al agar.⁴⁴

El crecimiento de esta bacteria cuando es cultivada en caldo se distingue por formar grumos insolubles.⁴⁴

La especie más típica de éste género es el *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, reconocido por ser un patógeno humano.⁴⁴

2.5.5 *Vibrio*

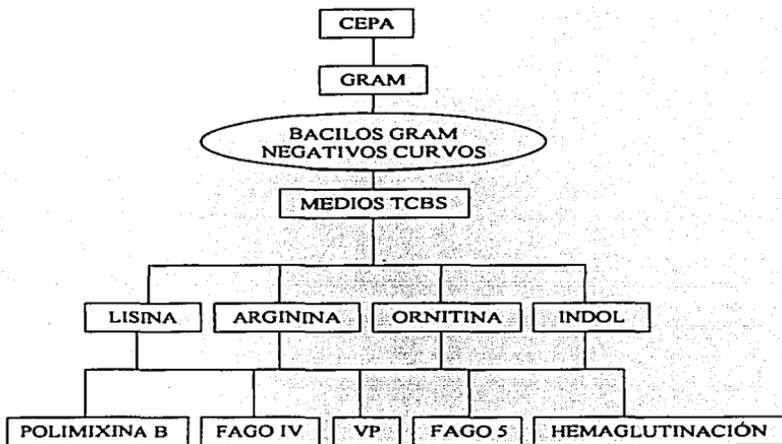
El género *Vibrio* se conforma por bacilos Gram negativos en forma de coma, de 0.4 a 0.6 por 1 a 3 μm , son anaerobios facultativos, algunos oxidasa positivos, móviles por flagelos peritricos y polares, no esporulan ni forman cápsula.^{16,27,44}

Éste género tiene la capacidad de crecer en medios de alta concentración salina y pH alcalino, lo que se convierte en unas características importantes para su aislamiento e identificación al sembrarse en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) donde crece formando colonias amarillas, lisas, de centro opaco y periferia trasparente (diagrama 7).¹⁶

Muchas especies son reconocidas por ser patógenos importantes en humanos, entre ellas destaca *Vibrio cholerae*, el cual para su identificación

requiere, además de varias de las pruebas bioquímicas de rutina conocidas como lisina, ornitina arginina, indol, y VP (tabla 12), pruebas de tipo inmunológicas, fagotípicas, de resistencia, etc., tales como aglutinación de eritrocitos de pollo, hemólisis de eritrocitos de carnero, resistencia a fagos, aglutinación con suero polivalente para detectar al antígeno somático O:1 que presentan las cepas más importantes de la especie, además de las cepas O:1 se dividen en dos biotipos conocidos como Clásico y Eltor (tabla 13) ¹³, y cada biotipo tiene tres serotipos que se distinguen por la distribución de los antígenos A, B y C que presentan y se denominan de la siguiente manera: Inaba (A,C), Ogawa (A, B) e Hikojima (A, B, C); de los cuales el último es poco común en México o se transforma en alguno de los otros. ⁴¹

DIAGRAMA 7D
IDENTIFICACIÓN DE *Vibrio*¹³



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 12
IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO *Vibrio*¹⁶

	Crec. sin NaCl	VP + 1% NaCl	Lisina	Ornitina	Arginina	Indol
<i>V. alginolyticus</i>	-	+	+	V	-	V
<i>V. cholerae</i>	+	V	+	+	-	+
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	+	+	-	-	-
<i>V. havialis</i>	-	-	-	-	+	V
<i>V. hollisae</i>	-	-	-	-	-	+

V= variable

TABLA 13
DIFERENCIACIÓN DE BIOVARIEDADES DE *V. cholerae* 0:1¹⁶

	Clásico	Eltor
Hemólisis de eritrocitos de camero	-	+
Vorges - Proskauer	-	+
Aglutinación de eritrocitos de pollo	-	+
Polimixina B, 50 UI	S	R
Fago Clásico IV	S	R
Fago Eltor 5	R	S

S= sensible, R= resistente

2.6 ACTINOMYCETALES

En este orden taxonómico se agrupan las familias, géneros y especies de bacterias llamadas filamentosas, algunas de las cuales producen pseudomicelios cortos microsifonados, Gram positivos, formados por bacilos cortos no esporulados; existen géneros con ácidorresistencia parcial, total o nula. Algunos de éstos géneros son: *Mycobacterium*, *Actinomadura*, *Nocardia* y *Streptomyces*.^{1,4,16,27,44}

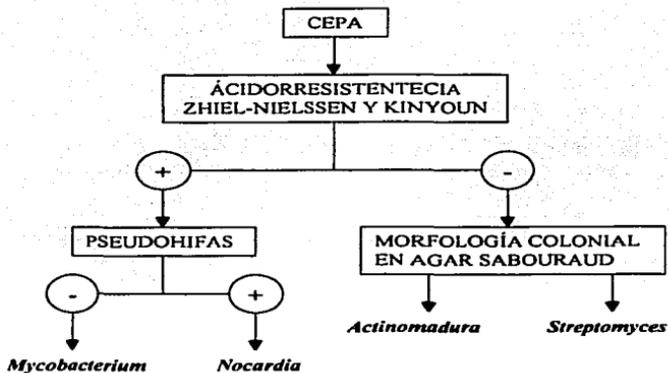
Para su observación microscópica se utiliza comúnmente la tinción de Zhiel-Nielsen, que utiliza una solución etanólica de fucsina básica fijada al calor y azul de metileno como colorante de contraste previa decoloración con ácido clorhídrico en solución etanólica; por éste método se observan los bacilos teñidos de rojo, los no ácidorresistentes y el entorno de azul. También se usa una modificación en frío de ésta técnica llamada tinción de Kinyoun, la cual utiliza los mismos colorantes con idénticos resultados.²⁷

Éstos organismos fueron confundidos durante un tiempo con hongos, pero al no encontrarles estructuras especializadas en reproducción asexual o una fase sexual y ser procariontes fueron reconocidos como bacterias. ^{4,16,44}

Algunos son aerobios estrictos, otros son anaerobios facultativos, crecen lentamente, aproximadamente 14 días en promedio, preferentemente en medios de cultivo con altas concentraciones de lípidos, los cuales son muy importantes en la composición de su pared, principalmente en el caso de los ácidosresistentes porque éstos lípidos son los que le confieren tal capacidad. ^{1,16,44}

La diferenciación de algunos de los géneros más comunes en función de sus propiedades se esquematiza en el siguiente diagrama:

DIAGRAMA 8
DIFERENCIACIÓN DE ACTINOMYCETALES. ^{1,16,44}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.6.1 *Mycobacterium*

Microorganismo bacilar no esporulado de 4.0 por 0.4 μm , aerobio estricto, con una composición de pared de cerca del 60% de lípidos y ceras, lo que lo hace ácidorresistente.^{1,16,44}

Para observarlo al microscopio se utilizan las técnicas de tinción de organismos ácidorresistentes ya mencionadas. Asimismo se utilizan técnicas de fluorescencia para la observación microscópica de las micobacterias.²⁷

Además la composición de pared de las micobacterias las convierten en organismos exigentes nutricionalmente que requiere medios de cultivo con fuentes de lípidos como glicerol, agar suero o agar huevo-papa, donde las colonias crecen con forma pequeña rugosa y seca; entre los medios de cultivo más utilizados destaca el medio de Lowenstein-Jensen, utilizado rutinariamente para su crecimiento.^{16,27,44}

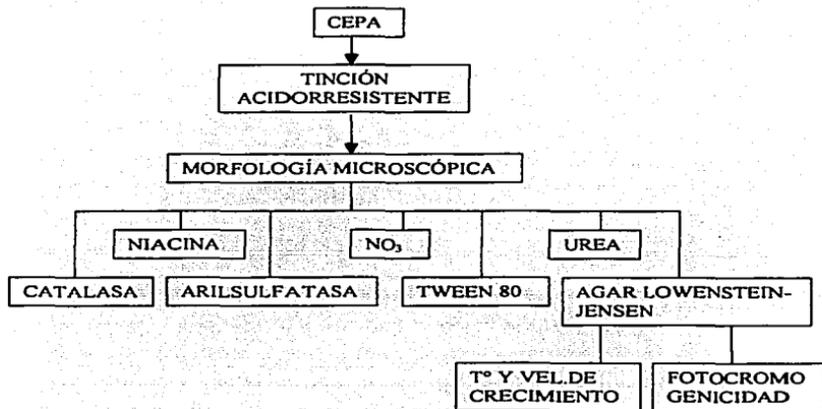
NO SE
DE LA MICROBIOLOGÍA

Las micobacterias se clasifican en función de su velocidad de crecimiento en rápidas (menos de 7 días), de velocidad intermedia (7 a 10 días) y lentas (más de 10 días) y por su capacidad de producir pigmentos en presencia de luz como fotocromógenas y no fotocromógenas.^{16,27,44}

Actualmente los investigadores trabajan en el desarrollo de medios selectivos para su aislamiento de muestras altamente contaminadas, ya que al crecer más lentamente que otros organismos corren el riesgo de dañarse con los desechos metabólicos de éstos, y en caso de crecer su aislamiento puro se complica.^{16,27,44}

El crecimiento lento de las micobacterias, además de sus perfiles bioquímicos característicos, son los criterios que permiten la identificación de las distintas especies del género, los cuales se ejemplifican en el diagrama 8A y la tabla 15.^{16,27}

DIAGRAMA 8A
IDENTIFICACIÓN DE *Mycobacterium* ^{16,27,44}



TEN
FALLA DE ORIGEN

TABLA 14
IDENTIFICACIÓN DE *Mycobacterium* ^{16,27,44}

	Tº y velocidad de crecimiento	Niacina	NO ₃	Catalasa 68°C pH 7	Tween 80 10 días	Arisulfatasa 3 días	Urea	Fotocromogenicidad
<i>M. tuberculosis</i>	37° C 12-25 d.	+	+	-	+/-	-	+	-
<i>M. bovis</i>	37°C 24-40 d.	-	-	-	-	-	+	-
<i>M. kansasii</i>	37°C 10-20 d.	-	+	-	+	-	+	+
<i>M. ulcerans</i>	32°C 28-60 d.	+/-	-	+	-	-	•	-
<i>M. marinum</i>	32°C 5-14 d.	-	-	-	+	+/-	+	+
<i>M. simiae</i>	37°C 7-14 d.	+	+/-	+	-	-	+	+

* sin datos suficientes

2.6.2 *Actinomadura*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Microorganismo Gram positivo, no es ácidoresistente, catalasa positivo, aerobio; no hidroliza urea y los filamentos que desarrolla no son tabicados. ^{4,39}

A. madurae forma colonias blanquecinas o beige de forma cerebriforme en agar Sabouraud, puede tardar en crecer al cultivarse hasta dos meses a temperatura ambiente, con esta excepción las demás especies

del género crecen entre 8-15 días; *A. pelletieri* muestra una morfología colonial semejante pero con una coloración rojiza en agar Sabouraud. ⁴

2.6.3 *Nocardia*

Este género está constituido por bacilos aerobios Gram positivos, no esporulados, catalasa positivos; el micelio vegetativo se segmenta en forma de rosario y el filamento aéreo en células que parecen esporas. ^{4,39}

Nocardia es parcialmente ácidorresistente debido a la presencia de ácidos micólicos denominados ácidos nocardólicos que tienen cerca de 50 carbonos, a diferencia de los ácidos micólicos que llegan a tener hasta 90 átomos de carbono en los bacilos ácidorresistentes, y los ácidos corinemicólicos de las cepas no ácidorresistentes que tienen de 32 a 36 carbonos, por lo que requieren, por lo que requieren sembrarse en Lowenstein-Jensen en primoaislamiento, tardando de 8 a 15 días en crecer.

2.6.4 *Streptomyces*

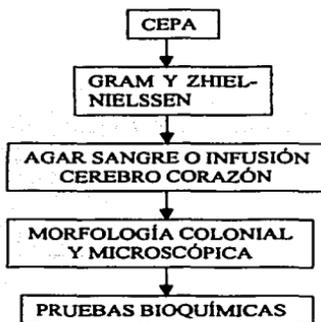
Género integrado por bacilos aerobios, Gram positivos, no ácidosresistentes; forma micelio vegetativo largo, altamente ramificado y no segmentado. ^{4,39,44}

El micelio aéreo puede ser poco desarrollado o muy extenso y puede presentar forma de hélice, espiral o con múltiples ramificaciones, muchas especies producen esporas en forma de cadena a partir del micelio aéreo, crece de 8 a 15 días a temperatura ambiente en agar Sabouraud, BHI o agar sangre. ⁴

La identificación de los géneros y algunas especies de actinomicetos se detalla en el diagrama 8b y la tabla 16.

DIAGRAMA 8B

IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS^{4,44}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 15
 DIFERENCIACIÓN DE ACTINOMICETOS⁴

ORGANISMO	MORFOLOGIA COLONIAL*	CASEÍNA	XANTINA	TIROSINA
<i>Actinomadura madurae</i>	Cerebriforme beige	+	-	+/-
<i>Actinomadura pelletieri</i>	Cerebriforme roja	+	-	-
<i>Nocardia asteroides</i>	Cerebriforme naranja	-	-	+/-
<i>Nocardia brasiliensis</i>	Cerebriforme naranja	-	+	-
<i>Streptomyces somaliensis</i>	Beige-gris con surcos	+	-	+

- en agar Sabouraud

TABLA 15A
 DIFERENCIACIÓN DE ACTINOMICETOS (continuación)⁴

ORGANISMO	ACIDORRESISTENCIA	HIPOXANTINA	UREA	GELATINA
<i>Actinomadura madurae</i>	-	+	-	+/-
<i>Actinomadura pelletieri</i>	-	+	-	-
<i>Nocardia asteroides</i>	+	-	-	+/-
<i>Nocardia brasiliensis</i>	+	-	+	-
<i>Streptomyces somaliensis</i>	-	+	-	+

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO 3

HONGOS

Los hongos son organismos eucariontes, inmóviles, no productores de clorofila, tienen pared celular compuesta de quitina, celulosa o ambas, son capaces de reproducirse por mecanismos sexuales o asexuales.³⁹

Son heterótrofos, con talos que pueden estar dentro o fuera del sustrato.¹

Crecen adecuadamente entre 10°C y 40°C con un intervalo óptimo de 20°C-37°C, aunque estas temperaturas varían con cada especie, casi todos crecen a temperatura ambiente mientras que los patógenos de mamíferos crecen a 37°C; son altamente afines a los carbohidratos y también son acidófilos, con un pH óptimo de crecimiento de 5.6.^{4,10}

Existen varios tipos de hongos que se diferencian de acuerdo con determinadas características. Una primera clasificación se basa en

características como el tamaño y la complejidad; así se clasifican empíricamente en macromicetos (setas) y micromicetos (hongos microscópicos), también se dividen en unicelulares (levaduras) y pluricelulares (filamentosos).^{1,4}

Una clasificación más formal se basa en la capacidad de reproducirse sexualmente dando lugar a una clasificación taxonómica, la cual aún se está transformando en la medida que se descubren nuevas propiedades en ellos.

Casi todos los hongos han mostrado la capacidad de reproducirse sexualmente; la reproducción sexual se lleva a cabo en tres fases que son plasmogamia (unión de citoplasmas), cariogamia (unión de núcleos haploides) y meiosis (duplicación y división en nuevos núcleos haploides en células hijas) y que dan por resultado las siguientes estructuras: ^{1,4,10,39}

Basidiosporas: formadas por células haploides a partir de esterigmas, las cuales provienen de una bolsa o basidio. ^{4,39}

Zigosporas: formadas por la fusión de hifas sexualmente diferenciadas aunque morfológicamente iguales llamadas donadoras (+) y receptoras (-), de cuya unión se forma un huevo o zigospora que da origen por meiosis al nuevo hongo.⁴

Ascosporas: esporas formadas por meiosis a partir de una bolsa o asca que contiene un número característico de esporas.⁴

Los hongos que presentan alguna de estas estructuras son clasificados en las categorías respectivas, aquellos cuya reproducción sexual es poco frecuente o no ha sido descubierta son clasificados como *Deuteromycetes*.

Un ejemplo de la clasificación actual es como sigue:^{1,10,28}

REINO	DIVISIÓN	SUBDIVISIÓN	CLASE	EJEMPLO
<i>Fungae</i> o <i>mycetae</i>	<i>Amastigomycota</i>	<i>Zygomycotina</i>	<i>Zygomycetes</i>	<i>Rhizopus</i>
		<i>Ascomycotina</i>	<i>Ascomycetes</i>	<i>Saccharomyces</i>
		<i>Basidiomycotina</i>	<i>Basidiomycetes</i>	<i>Amanita</i>
		<i>Deuteromycotina</i>	<i>Deuteromycetes</i>	<i>Aspergillus</i>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1 LEVADURAS

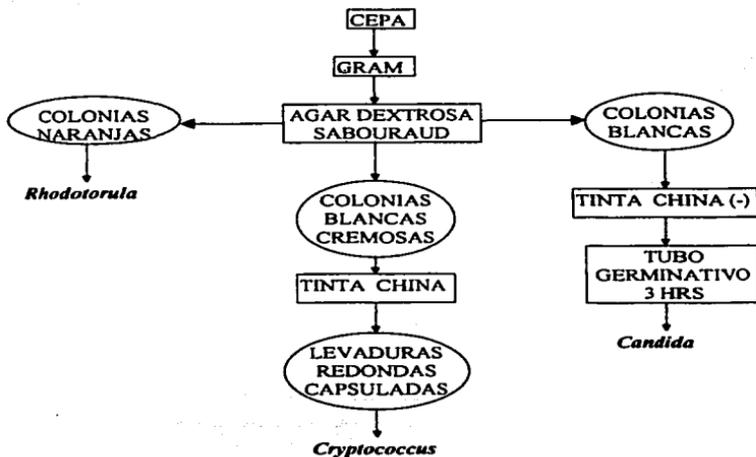
Microorganismos de tipo unicelular, eucariontes, se reproducen por blastosporas, aunque en algunas especies como *C. albicans* y ocasionalmente *C. stellatoidea* se observan clamidosporas al sembrarse en medios de cultivo como el medio de harina de maíz (corn meal) con tween 80. Se observan en medios de cultivo formando colonias semejantes a las de bacterias, algunos producen un pseudomicelio unicelular en ciertos medios.

1,4,9,10,28,39

La colección comprende los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula* los cuales se diferencian de acuerdo a los criterios señalados en el diagrama 9.

DIAGRAMA 9

DIFERENCIACIÓN DE LEVADURAS^{1,4}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1.1 *Candida*

Género que agrupa a varias especies de levaduras, algunos ejemplos son: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. utilis*, etc. Su tamaño es de 2-3 por 4-6 μm , tienen forma oval y se tiñen como Gram positivos, tiene propiedades dimórficas ya que, por ejemplo, *C. albicans* puede presentar pseudomicelio en suero humano o de conejo y micelio verdadero en microcultivo. ^{1,4,10,28,39}

Candida crece a un intervalo de pH entre 4.5 y 7.5 con una acidez óptima entre 5.0-5.6. Existen medios de cultivo para éste género como el agar Biggy, en el cual las colonias crecen de un color café; o el agar micosel, donde *C. albicans* crece perfectamente, en éste último existe el riesgo de que algunas especies distintas a *C. albicans* sean inhibidas por la ciclohexamida. ^{4,10}

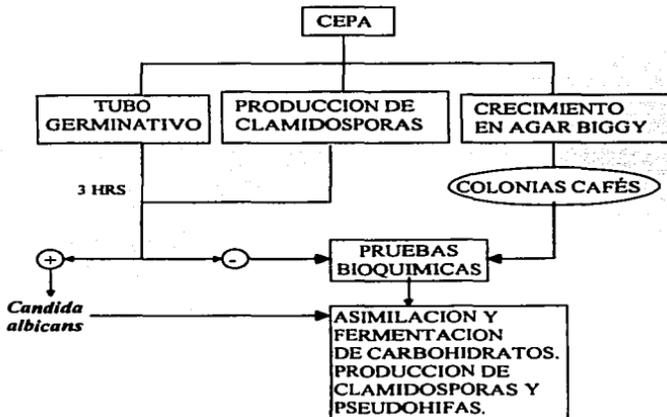
Para identificar las diferentes especies se requiere de pruebas de utilización de carbohidratos (tabla 17); en el caso de *C. albicans*, una prueba que la distingue de las demás especies es la formación de un

filamento de cerca de 5 a 15 μm al incubarse en suero humano por no más de 3 hr a 37°C, o por la producción de clamidosporas, las cuales son estructuras de resistencia que aparecen bajo condiciones adversas de temperatura, bajos niveles de oxígeno, humedad, nutrientes, etc, para inducir la formación de clamidosporas se efectúan cultivos en medios como agar harina de maíz con Tween 80, agar arroz con Tween 80 comercial o preparado en el laboratorio o agar clamidosporas comercial.^{1,4,28}

La identificación del género se ilustra en el diagrama 9A:

DIAGRAMA 9A

DIFERENCIACIÓN DE *Candida* ^{1,4,9,10,28}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1.2 *Cryptococcus*

Levadura grande, redonda u oval y capsulada de 15-20 μm incluyendo la cápsula, destaca la especie *C. neoformans* como la más importante del género, produce colonias grandes de aspecto liso, color blanco y consistencia suave en medios de cultivo, al teñirse con Gram se observa como Gram positiva y al teñirse con tinta china se puede distinguir la cápsula como una estructura refringente no teñida alrededor de la levadura. ^{1,4,9,10,28,39}

La cápsula es el principal determinante antigénico y de patogenicidad de ésta levadura, a partir de su composición de polisacáridos se distinguen cuatro serotipos llamados A, B, C, y D y que se diferencian por reacciones serológicas o de cultivo, por ejemplo los serotipos B y C resisten la presencia de ciclohexamina o canavanina y utilizan glicina y malato como fuente de nitrógeno y carbono a diferencia de los serotipos A y D, los cuales producen amoníaco que inhibe la creatinina desaminasa de los serotipos B y C. ^{10,39,44}

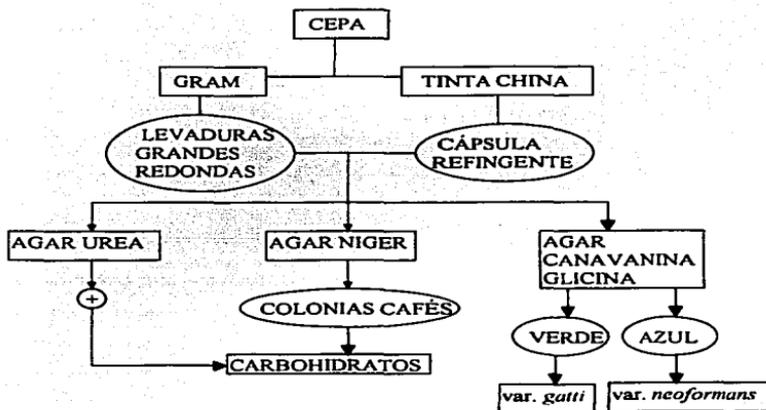
Existen además dos serovariedades conocidas en el género de *C. neoformans*, una llamada *gatti* y otra *neoformans*, las cuales se diferencian por pruebas antigénicas y fisiológicas, o por su crecimiento en agar canavanina glicina azul de bromotimol, en el cual la variedad *gatti* utiliza la glicina como fuente de carbono y nitrógeno, no se inhibe a la presencia de la canavanina y altera el pH del medio tomándolo amarillo verdoso diferencia de la variedad *neoformans* que no produce tal efecto. Hay autores que las consideran especies diferentes, se ha observado que la variedad *gatti* produce pseudomicelio in vivo e in vitro.⁴

Además de las características ya mencionadas, éste género se identifica por su crecimiento en agar niger, donde forma colonias de color café por la transformación del ácido cafeínico a un polímero semejante a melanina mediada por fenoloxidasas. Bioquímicamente se observa hidrólisis de urea y un perfil característico de asimilación y fermentación de carbohidratos (tabla 11).^{1,4,9,10,28,39}

El proceso de identificación del género se muestra en el diagrama 9B.

DIAGRAMA 9B

IDENTIFICACIÓN DE *Cryptococcus* 1.4.9.10.28.39



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1.3 *Rhodotorula*

Aunque éste género es más conocido como contaminante, sus características coloniales son de interés comparativo con respecto a las demás levaduras, ya que forma colonias de pigmentación carotenoide y consistencia cremosa; microscópicamente no se observa la presencia de pseudomicelios o clamidosporas, se reproduce por blastosporas de 2-4 μm de diámetro.⁴

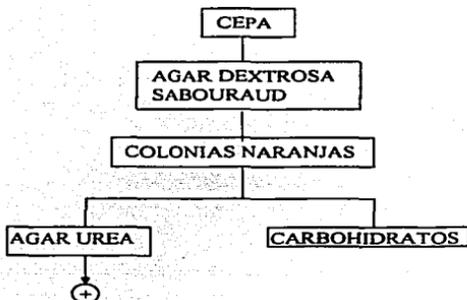
Bioquímicamente se observa que esta levadura puede efectuar hidrólisis de urea, lo que podría generar confusión con *Cryptococcus*, sin embargo su morfología colonial, microscópica y su incapacidad de asimilar inositol la distinguen.

Los criterios de identificación para esta levadura son la morfología colonial, microscópica y un perfil característico de asimilación y fermentación de carbohidratos (tabla 11).^{4,10,28,39}

La identificación de esta levadura se detalla en el diagrama 9C

DIAGRAMA 9C

IDENTIFICACIÓN DE *Rhodotorula* ^{4.10.28.39}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 16
 REACCIONES DE CARBOHIDRATOS DE LEVADURAS^{4,9,10,28,39}

LEVADURA	C.alb	C.gla	C.gui	C.kru	C.par	C.ste	C.tro	Rho.	C. neo
ASIMILACIÓN									
GLUCOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	-
MALTOSA	+	-	+	-	+	+	+	+	-
SACAROSA	+	-	+	-	+	-	+	+	-
LACTOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GALACTOSA	+	-	+	-	+	+	+	+	-
TREALOSA	+	+	+	-	+	+	+	+	-
FERMENTACIÓN									
GLUCOSA	F	F	F	F	F	F	F	-	-
MALTOSA	F	-	-	-	-	F	F	-	-
SACAROSA	-	-	F	-	-	-	F	-	-
LACTOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GALACTOSA	F	-	F	-	F	-	F	-	-
TREALOSA	F	F	F	-	-	-	F	-	-

Abreviaturas: C.alb = *C. albicans*; C. gla = *C. glabrata*; C.gui = *C. guilliermondii*; C.kru = *C. krusei*; C.par = *C. parapsilosis*; C.ste = *C. stellatoidea*; C.tro = *C. tropicalis*; Rho = *Rhodotorula*; C.neo = *Cryptococcus neoformans*.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

3.2 HONGOS FILAMENTOSOS

Hongos pluricelulares constituidos por estructuras llamadas hifas y que en conjunto se denomina micelio; su reproducción es basada en esporas o conidias que se generan a partir de un micelio reproductivo o aéreo a diferencia del micelio vegetativo que sirve como estructura de fijación al medio de cultivo y de nutrición.^{4,10,28,39}

Dentro de su metabolismo primario y secundario, muchos hongos producen metabolitos de importancia farmacéutica, industrial o alimenticia como antibióticos, alcaloides, psicotrópicos, vitaminas, proteínas, etc.³⁹

La reproducción asexual está presente en todos los hongos y es el mecanismo más importante de propagación de la especie, ya que ocurre un mayor número de ocasiones que la sexual que ocurre esporádicamente y es útil para la identificación de géneros en cultivos de laboratorio al observar sus estructuras^{4,10,28}. Las estructuras de reproducción asexual son las siguientes:

Talosporas: esporas que se forman de la hifa por fragmentación (artrosporas), gemación (blastosporas), engrosamiento (clamidosporas), reticulación (dictiosporas), y las que surgen de la hifa sin caer en alguno de los casos anteriores como en los dermatofitos (aleuriosporas).^{4,39}

Conidias: son las formadas en estructuras especializadas y se dividen en dos tipos; unicelulares (microconidias) y pluricelulares (macroconidias). Las estructuras de formación de conidias son las prolongaciones especializadas de la hifa (conidióforos), ramificaciones de las hifas (esterigmas), estructuras en forma de botella (fiálides), y las que sostienen las bolsas membranales o esporangios (esporangióforos).^{4,39}

Éste grupo abarca una gran variedad de géneros entre los cuales se encuentran: los dermatofitos; éste es un grupo de hongos que incluyen tres géneros de importancia clínica: *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporium*.^{4,9,10,28,39}

El género *Aspergillus* abarca especies de importancia clínica e industrial, por ejemplo *A. niger*, una especie de importancia industrial por su capacidad de producir ácido cítrico.³⁹

Existen hongos dimórficos, los cuales tienen la capacidad de alternar entre la forma micelial y levaduriforme, algunos son nutriente dependientes como *C. albicans* que en medios pobres toma forma micelial y en medios ricos la levaduriforme; otros son temperatura y nutriente dependientes, formando micelios en medios pobres a 25-28°C y levaduras en medios ricos a 35-37°C, algunos ejemplos son: *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum*; otros pueden requerir presencia de dióxido de carbono, por ejemplo *Mucor rouxi*. También hay hongos bifásicos que pueden pasar de la forma micelial a otra distinta a la levaduriforme, por ejemplo *Coccidioides immitis* que toma forma de esférulas en su fase parasitaria.^{4,39}

La identificación de los hongos se basa en los siguientes criterios (diagrama 9):^{4,10}

Por el grosor de la hifa:

Menor a 1 μm : microsifonados

Mayor a 1 μm : macrosifonados

Por la presencia o ausencia de septos en las hifas:

Septados

No septados o cenocíticos.

Por la pigmentación que presentan:

Sin pigmento: hialinos

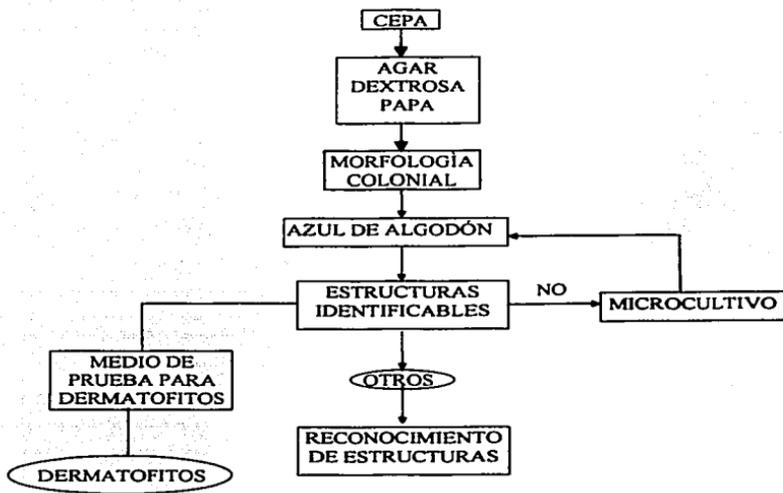
Pigmento amarillo-naranja: carotenoides

Pigmento café-negro: dematiáceos

El desarrollo de estas estructuras se ve favorecido si se siembran los hongos por la técnica de microcultivo, la cual proporciona una mayor superficie de crecimiento en una mínima cantidad de medio de cultivo, más humedad y mayor facilidad de manipular la muestra para la observación microscópica reduciendo el riesgo de dañar las estructuras.

DIAGRAMA 10

IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICELIALES^{4,10}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A continuación se mencionan algunos ejemplos de hongos filamentosos y se describirán algunas de sus estructuras.

<i>Alternaria</i>	Hifas color amarillo, septadas, dictiosporas marrones con septos transversales y longitudinales multicelulares.
<i>Cladosporium</i>	Hifas amarillas, septadas, conidióforos ramificados terminados en cadenas de conidias.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hifas hialinas septadas, conidióforos terminados en esterigmas que producen cadenas de conidias.
<i>Aspergillus niger</i>	Hifas hialinas septadas, conidióforos largos poco visibles por la gran cantidad de esporas negras.
<i>Aspergillus flavus</i>	Hifas hialinas septadas, conidióforos con dobles hileras de esterigmas y conidias en cadenas cortas.
<i>Penicillium</i>	Hifas hialinas septadas, conidióforos ramificados en filídes que originan esterigmas y terminan en largas cadenas de conidias.
<i>Microsporium canis</i>	Hifas y microconidias poco visibles, macroconidias multiseptadas de pared gruesa.
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Microconidias abundantes en racimos, hifas en espiral microsifonadas, macroconidias alargadas.
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Microconidias ausentes, macroconidias grandes, lisas multicelulares en forma de clava.
<i>Rhizopus</i>	Hifas macrosifonadas no septadas terminadas en rizoides, esporangióforo terminado en bolsa que contiene varias conidias.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- * Establecer un cepario de bacterias y hongos en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán para brindar apoyo a las actividades académicas y de investigación en el área de microbiología.
- * Promover con el cepario el desarrollo de programas de investigación, diagnóstico, servicio social y tesis.

OBJETIVOS PARTICULARES

- * **Recopilar cepas de diversas fuentes tales como muestreo ambiental, clínico, donaciones, intercambios, prácticas académicas, etc..**
- * **Realizar la caracterización correspondiente a cada microorganismo.**
- * **Establecer el método de conservación más adecuado para cada cepa.**
- * **Evaluar pureza y viabilidad antes y después de la conservación.**
- * **Registrar la información en el archivo del cepario.**
- * **Proveer las cepas disponibles a quien las solicite.**

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA

4.1 BACTERIAS

4.1.1 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

Las bacterias se sometieron a los criterios de identificación señalados en el capítulo 2 para conocer el género y especie de las mismas si este dato no es conocido o para corroborarlo en el caso de que ingresen con una identidad previa.

4.1.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Las bacterias se inoculan en un matraz con caldo casoy y se colocan en baño de agitación a 37°C y 150 revoluciones por minuto en un sistema cerrado; el crecimiento es seguido por lecturas espectrofotométricas de turbidez hasta alcanzar una concentración igual al tubo 0.5 del nefelómetro

de MacFarland, que es equivalente a 10^8 unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

4.1.3 CUENTA VIABLE POR ESPARCIMIENTO EN PLACA

Una vez alcanzada la concentración, se toman 0.5 ml del caldo y se vierten en un tubo con 5 ml de solución salina fisiológica estéril y de ahí se hacen diluciones sucesivas desde 10^{-1} hasta 10^{-8} . Posteriormente se toman 0.1 ml de las últimas 5 diluciones y se inoculan en cajas petri con agar casoy o infusión cerebro corazón esparciendo el inóculo con espátula de Driglasky por duplicado; las cajas se incuban a 37°C por 24 hrs. Al finalizar el período de incubación, se realiza el conteo y se multiplica el resultado por el factor de dilución, expresando el resultado en UFC/ml.

4.1.4 CONSERVACIÓN

Del tubo con caldo usado en la cinética se toman 20 μ l y se inoculan en tubos con 10 ml de agar base sangre inclinado. Por cada cepa se forman

lotes de 6 tubos y se distribuyen entre los diferentes tipos de sellado, temperaturas y plazos.

4.1.5 EVALUACIÓN POST-CONSERVACIÓN

Al cumplirse los plazos respectivos, los tubos y viales se sacan de la conservación, se toman muestras de los tubos y se incuban para reactivarlos, se efectúa tinción de gram, resiembra y se realizan pruebas de identidad para corroborar la viabilidad y pureza.

4.2 HONGOS

4.2.1 IDENTIFICACIÓN DE HONGOS

Los hongos son identificados siguiendo los procedimientos detallados en el capítulo 3 y bajo los mismos criterios que en el caso de las bacterias, tanto para la identificación de las cepas sin identificar como para confirmar a las ya identificadas.

4.2.2 CONSERVACIÓN

Todos los hongos son inoculados por triplicado en tubos con agar dextrosa Sabouraud inclinado y mantenidos en refrigeración a 4°C por un plazo mínimo de tres meses hasta un máximo de 18 meses.

4.2.3 EVALUACIÓN POST-CONSERVACIÓN

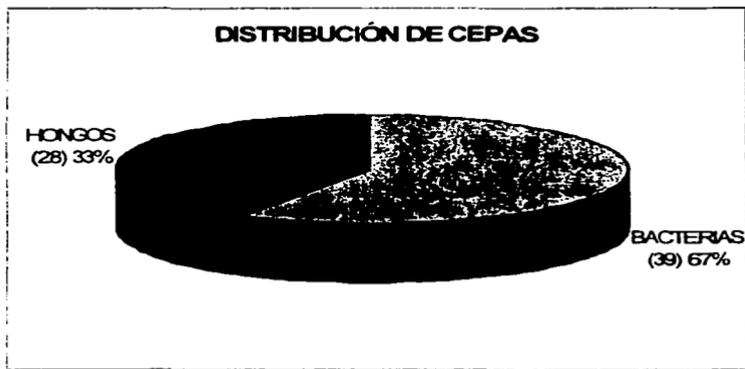
Al término del periodo se evalúa su viabilidad y pureza por resiembra en medio nuevo, observación de morfología colonial, tinciones y demás reacciones características de identificación señaladas en el capítulo 3.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

En este trabajo se logró una colección total de 67 cepas, 39 bacterias (67%) y 28 hongos (33%), cuya distribución se muestra en la siguiente gráfica:

GRÁFICA I



5.1 BACTERIAS

5.1.1 CEPAS

Hasta la finalización del presente trabajo, el cepario cuenta con 34 bacterias; 18 gram positivas (46%), 16 gram negativas (41%) Y 5 actinomicetos (13%) las cuales se mencionan en el siguiente listado:

GRAM POSITIVAS

Bacillus subtilis

Corynebacterium diphtheriae

Listeria monocytogenes

Micrococcus

Staphylococcus aureus ATCC 12598

Staphylococcus aureus β -lisina

Staphylococcus aureus Cowan-I

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus saprophyticus

Streptococcus agalactiae

GRAM NEGATIVAS

Bordetella bronchiceptica

Citrobacter freundii

Enterobacter aerogenes

Escherichia coli

Escherichia coli W 3350

Klebsiella oxytoca

Klebsiella pneumoniae

Pasteurella multocida

Proteus mirabilis

Pseudomonas aeruginosa

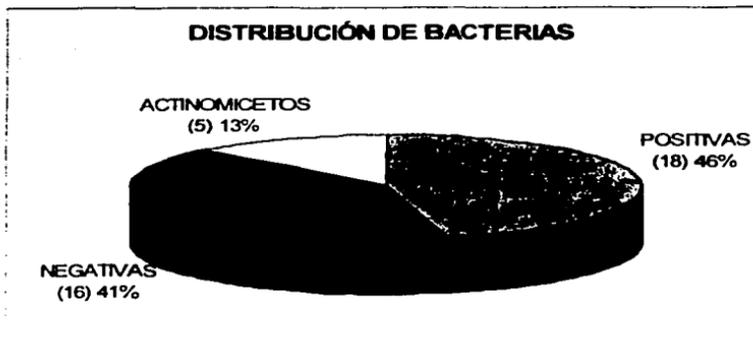
<i>Streptococcus grupo B</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Streptococcus grupo B β-hemolítico</i>	<i>Salmonella tify</i>
<i>Streptococcus β-hemolítico II</i>	<i>Salmonella tiphymurium</i>
<i>Streptococcus grupo D</i>	<i>Serratia spp.</i>
<i>Streptococcus fecalis ATCC 10471</i>	<i>Shigella spp.</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Vibrio cholerae var. inaba</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
<i>Streptococcus viridans</i>	

ACTINOMICETOS

<i>Actinomadura madurae</i>	<i>Nocardia asteroides</i>
<i>Actinomadura pelletieri</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>
<i>Streptomyces spp.</i>	

La distribución de las cepas bacterianas se muestra en el siguiente gráfico:

GRÁFICA 2



5.1.2 RECUPERACIÓN POST-CONSERVACIÓN

Varias bacterias fueron sometidas a los diferentes tiempos, métodos y temperaturas de conservación obteniéndose los siguientes resultados:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 17

VIABILIDAD DE BACTERIAS A CORTO PLAZO (8-15 DÍAS)

SELLADO	SIN SELLO			SELLO DE CERA			CERA Y ACEITE *		
	4°C	0°C	-20°C	4°C	0°C	-20°C	4°C	0°C	-20°C
<i>S. aureus</i> ATCC	C	C	C	P	P	C	-	-	-
<i>S. aureus</i> C-1	P	P	C	P	P	P	-	-	-
<i>S. aureus</i> β -lisina	P	P	C	P	C	C	-	-	-
<i>St. fecalis</i> ATCC	P	C	P	P	C	P	-	-	-
<i>E. coli</i>	C	P	C	P	P	C	-	-	-
<i>S. typhi</i>	P	C	C	P	C	C	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	C	-	-	P	-	-	-	-	-

Notas: P=bact. Puras; C=bact. Contaminadas; -=bact. Muertas; *=aceite vegetal comestible

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 18

VIABILIDAD DE BACTERIAS A MEDIANO PLAZO (40-90 DÍAS)

SELLADO	SIN SELLO			SELLO DE CERA			CERA Y ACEITE *		
	4°C	0°C	-20°C	4°C	0°C	-20°C	4°C	0°C	-20°C
TEMPERATURA									
<i>S.aureus ATCC</i>	P	-	-	P	-	-	-	-	-
<i>S.aureus C-I</i>	P	P	-	P	P	P	-	-	-
<i>S. aureus β-lisina</i>	P	C	P	P	-	-	-	-	-
<i>St. fecalis ATCC</i>	C	-	C	P	C	P	-	-	-
<i>E. coli</i>	P	P	-	P	C	-	-	-	-
<i>S. typhi</i>	C	P	C	P	P	C	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	C	-	-	C	-	-	-	-	-

Notas: P=bact. Puras; C=bact. Contaminadas; -=bact. Muertas; *=aceite vegetal comestible

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 19

VIABILIDAD DE BACTERIAS A LARGO PLAZO (1-3 AÑOS)

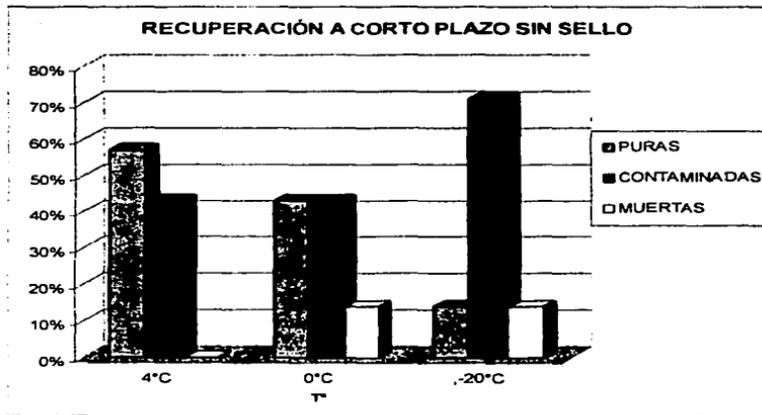
SELLADO	SIN SELLO			SELLO DE CERA			CERA Y ACEITE *		
	4°C	0°C	-20°C	4°C	0°C	-20°C	4°C	0°C	-20°C
<i>S. aureus</i> ATCC	C	C	-	P	C	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> C-1	P	-	C	P	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> β -lisina	C	P	-	C	P	C	-	-	-
<i>St. fecalis</i> ATCC	C	C	-	P	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	P	-	-	P	P	-	-	-	-
<i>S. typhi</i>	P	P	-	C	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Notas: P=bact. Puras; C=bact. Contaminadas; -=bact. Muertas; *=aceite vegetal comestible

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

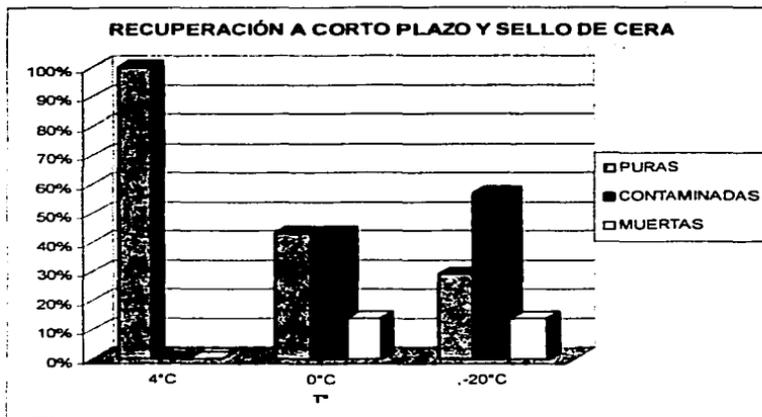
Los resultados de éstas tablas se pueden visualizar de manera respectiva en las gráficas que se presentan a continuación.

GRÁFICA 3



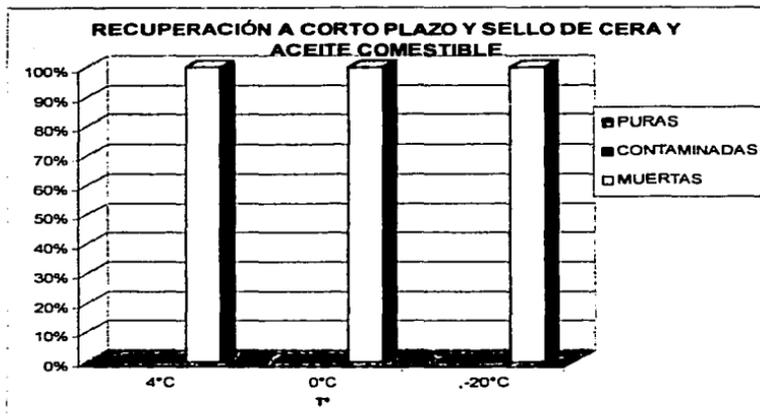
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 4



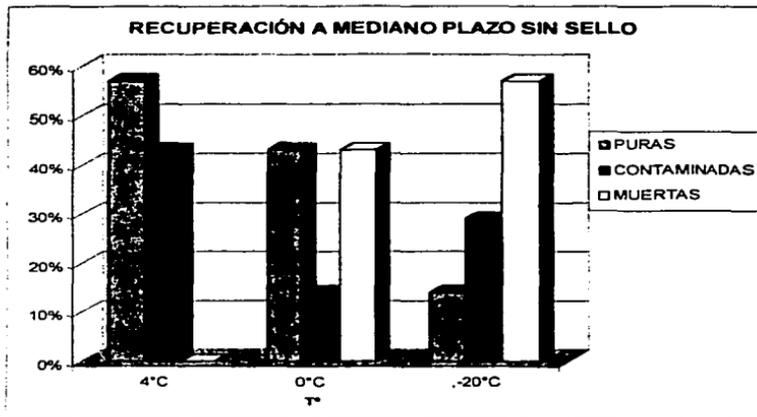
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 5



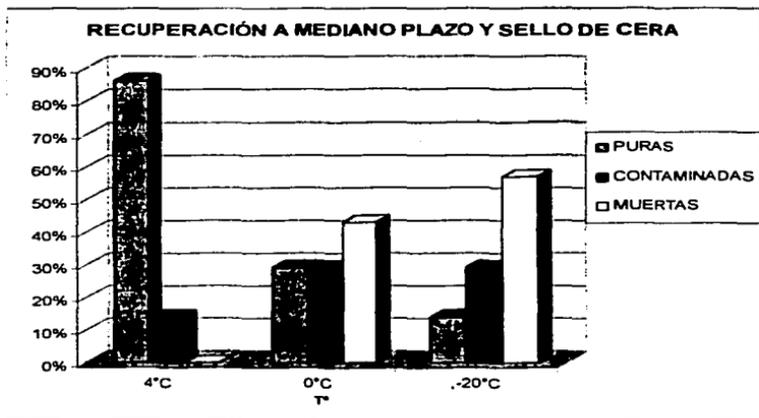
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 6



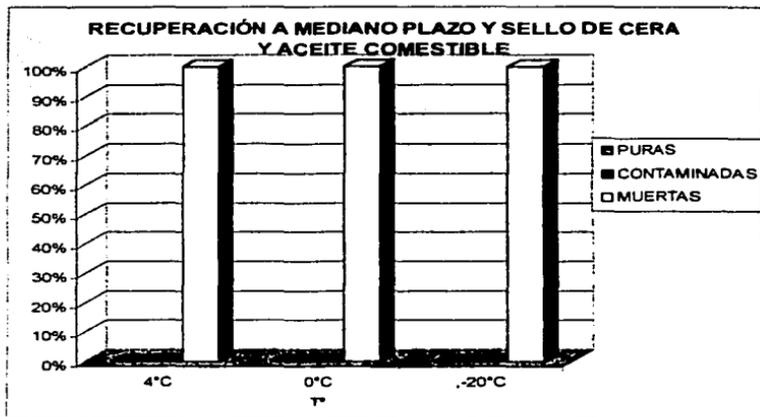
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 7



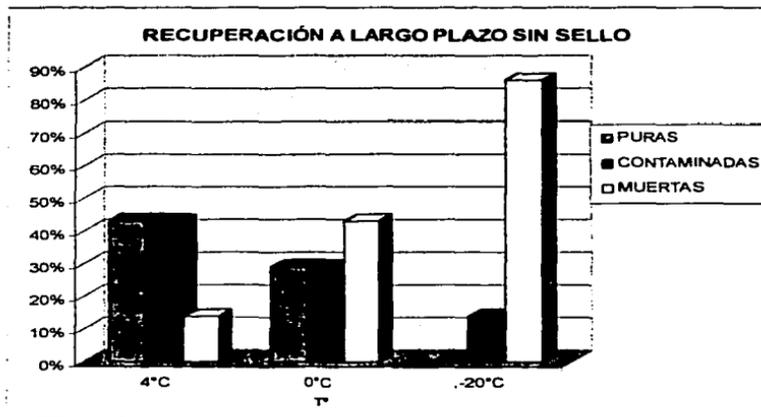
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 8



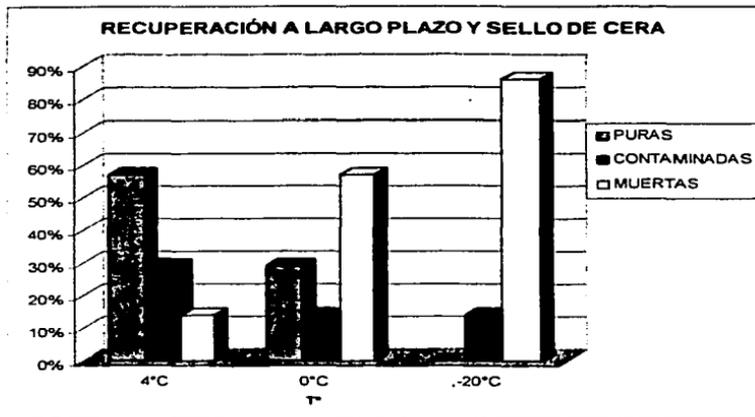
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 9



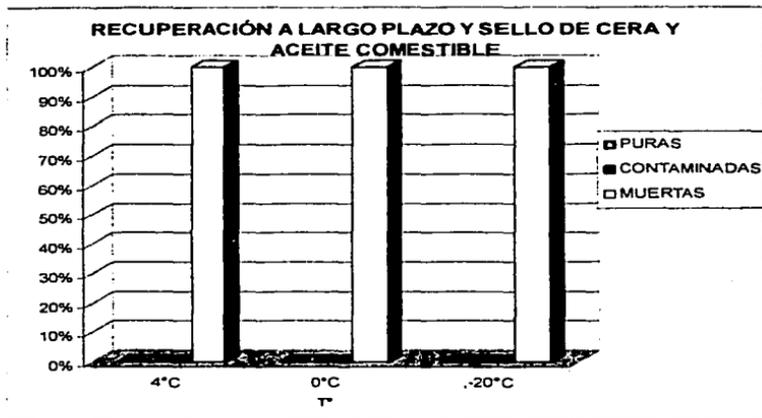
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 10



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 11



5.1.3 VIABILIDAD

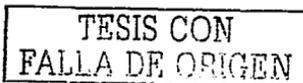
Al probar la viabilidad de las cepas se observa que *Bacillus subtilis* no sobrevive a más de 4°C y de mediano plazo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el género *Streptococcus* se observa crecimiento tras la conservación incluso a largo plazo; pero a excepción de los pertenecientes al grupo D, los demás no recuperaron sus propiedades bioquímicas características.

5.2 HONGOS

5.2.1 CEPAS



Hasta la terminación del presente trabajo se cuenta en el cepario con 28 diferentes hongos divididos en. 12 levaduras (43%), 15 miceliales (53%) y 1 dimórfico (4%) los cuales se enlistan a continuación:

LEVADURAS

Candida albicans

Candida albicans ATCC 10231

Candida glabrata

Candida guilliermondii

Candida krusei

MICELIALES

Alternaria spp.

Aspergillus flavus

Aspergillus fumigatus

Aspergillus niger

Cladosporium spp.

Candida parapsilosis

Candida stellatoidea

Candida tropicalis

Candida utilis

Cryptococcus neoformans A

Cryptococcus neoformans B

Rhodotorulla

DIMÓRFICOS

Sporothrix schenckii

Colletotrichum spp.

Fusarium spp.

Microsporium canis

Penicillium spp.

Phialophora verrucosa

Rhizopus spp.

Trichophyton mentagrophytes

Trichophyton rubrum

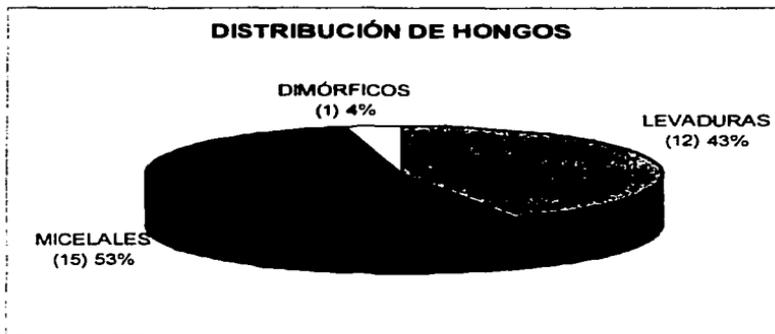
Trichophyton terrestre

Trichophyton tonsurans

La distribución de las cepas micológicas se muestra en el siguiente gráfico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 12



5.2.2 RECUPERACIÓN POST-CONSERVACIÓN

A excepción del *Epidermophyton floccosum*, todas las cepas fueron recuperadas de manera pura tras la conservación.

5.2.3 VIABILIDAD

Todas las cepas conservaron intactas sus características morfológicas, bioquímicas y de crecimiento.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

BACTERIAS

Los tubos sin sello mostraron una recuperación aceptable, la cual se reduce conforme se incrementa el tiempo y disminuye la temperatura. Éstos tubos se encuentran expuestos a contaminación y deshidratación de los agares.¹⁵

Los tubos con sello de cera logran una mejor conservación del medio de cultivo y ausencia de contaminación en la gran mayoría de los casos aún a largo plazo, como lo mencionan Gallardo y cols.¹⁵; el inconveniente que presentan es que al romperse el sello para tomar muestras, se desprenden fragmentos de cera que caen al interior ensuciando el cultivo e introduciendo contaminación del exterior. La efectividad de éste método se reduce con las temperaturas bajas, lo cual daña los medios de cultivo y las cepas por falta de un crioprotector adecuado de la misma manera que a los tubos sin sello.^{2,34,42}

Los tubos con aceite no aportaron beneficios a la conservación de las cepas a ningún plazo ni temperatura. Se utilizó aceite vegetal comestible con el fin de probarlo como una alternativa económica para crioprotección sin buenos resultados; el aceite a bajas temperaturas forma un depósito de grasa sólida que hace imposible la recuperación de las cepas probadas, lo cual lo imposibilita para ser usado aún como método de protección contra deshidratación como el aceite mineral usado por De la Cruz ¹², Foster ¹⁴, Gallardo ¹⁵ y Martínez Cruz ³¹; por lo que no es una opción eficaz.⁴²

De los métodos de conservación probados para bacterias se encontró que el más adecuado es la refrigeración en base agar sangre a 4°C con sello de cera, seguido de la conservación en tubos sin sello, ya que éstos mostraron mayor índice de contaminación. Con base en esto, las cepas de reciente ingreso se han conservado a 4°C con sello de cera.

El género *Streptococcus* logró ser conservado dentro de éste estudio; pero, a excepción del grupo D, los demás miembros de éste género perdieron sus propiedades bioquímicas. Se observa que las bacterias crecen

al ser recuperadas y preservan su morfología y coloración característica en tinción de gram, pero no muestran sus propiedades originales como hemólisis, hidrólisis de hipurato, solubilidad en bilis, etc. Esto puede deberse a una disminución de la actividad de las autolisinas que no destruyeron las células pero sí las estructuras, enzimas o genes que daban las propiedades; o a la retracción por parte de las mismas bacterias de éstos determinantes patogénicos por no serle necesarios durante su cultivo en medios artificiales y bajo conservación. La opción para éste género es la búsqueda de condiciones favorables y medios de cultivo adecuados como recomienda Carrillo y cols.⁶

Bacillus subtilis fue la bacteria de la colección más sensible, ya que no resistió más allá del mediano plazo sin contaminarse y morir; por lo cual se recomienda conservarlo en forma esporulada, ya que las esporas que produce son un buen mecanismo de resistencia contra las agresiones ambientales y las que implica la conservación.

HONGOS

En todos los cultivos, a excepción de uno, se observa buena recuperación sin pérdida de sus propiedades bioquímicas y morfológicas tras haber sido cultivados después de la conservación y de realizarse las pruebas correspondientes a cada tipo de hongo; sin embargo esto no debe descartar la posibilidad de usar crioprotectores cuando se requiera conservarlos a temperaturas menores y plazos mayores. ^{9,20}

Aún es necesario determinar métodos y plazos más convenientes para lograr una mejor conservación y reducir los riesgos que involucra la resiembra frecuente. ^{9,15,20,30,31,34,38,40,42}

Se observa contaminación en cultivos como resultado de la incubación simultánea de diferentes cepas y por el uso de tapones de algodón o tapones de rosca semiabiertos para permitir acceso de aire,⁹ por lo cual se recomienda procurar incubar las cepas lo más separado posible y sellar los tubos ya crecidos para evitar el deterioro de los agaros. ¹⁵

El único hongo que no resistió la conservación en refrigeración fue *Epidermophyton floccosum*, lo cual deja la opción a conservarlo a temperatura ambiente con el peligro de deshidratación del medio de cultivo, agotamiento de nutrientes, y los riesgos inherentes a la resiembra.^{9,15,30,31,34,42} La deshidratación puede evitarse con un sellado de los tubos,⁹ y la resiembra con algún otro método que permita su conservación a mayores plazos sin daño a la viabilidad.

Para ésta cepa en particular, Chávez, Valencia⁹ y Rybnikar⁴⁰ han observado que la liofilización la daña notoriamente; no obstante, otras opiniones como Munguía³⁴ y Valero⁴², consideran que ésta es totalmente apropiada. Debe continuarse buscando un método óptimo para éste hongo.

Se observó que el único método probado en éste estudio para hongos es adecuado para casi la totalidad de las cepas; aunque no se debe descartar otras metodologías que favorezcan la conservación, reduzcan el espacio ocupado, los gastos en material, medios de cultivo, energía, etc.; además de reducir los riesgos de contaminación, daño del cultivo, mutaciones, pérdida de viabilidad, y otros.^{9,30,34,42}

Existen otras variables que pueden influir en la viabilidad de los microorganismos y que debieran ser estudiados y controlados con fines de conservación, éstas variables son; presión osmótica, concentración de sales, electrolitos y metales, y el pH. ^{14,18,19,24,29,33,35,36,37,38}

CONCLUSIONES

1. Se ha logrado crear un cepario de bacterias y hongos, el cual ya presta sus servicios a las asignaturas de la sección, las cuales son:

Microbiología General I

Microbiología Farmacéutica

Microbiología General II

Microbiología Industrial

Micología Médica

2. Con los recursos que cuenta el cepario hasta la fecha, se han promovido actividades de servicio social y tesis.

3. Las cepas existentes en ésta colección provienen de muestreo ambiental, clínico y de donaciones de diversas instituciones como Facultad de Química, CINVESTAV, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, etc.

4. Toda cepa que ingresa es probada en sus características para corroborar su identidad, pureza y viabilidad; lo que además sirve de referencia para la evaluación postconservación.

5. No se han establecido métodos de conservación propicios a cada cepa específica como proponen varios autores por falta de muchos de los recursos necesarios.

6. La información generada durante el trabajo se registró en los archivos correspondientes del cepario.

7. El cepario ha proporcionado servicio a otras dependencias de la facultad y a otras instituciones y personas que lo soliciten.

RECOMENDACIONES

Para pruebas posteriores dentro de éste proyecto, se recomienda evaluar los demás métodos utilizados por otras colecciones. ^{2,6,7,9,12,13,15,20,21,31,32,34,40,42}

En lo que se refiere a los métodos de congelación y ultracongelación, se recomienda usar glicerol como crioprotector, ya que el dimetilsulfóxido interfiere con la viabilidad de los cultivos. ^{2,6,12,15,21,23,31,34,40,42,43} Actualmente se están poniendo en marcha proyectos para probar liofilización de bacterias y hongos dentro de la cátedra del cepario.

Para finalizar, es importante hacer la puntualización de que el cepario requiere de varios elementos para mejorar sus actividades y los resultados de las mismas hasta llegar a ser una colección de referencia reconocida a nivel nacional y mundial; una de ellas es la organización y planeación adecuada de las actividades para agilizar las labores, optimizar los materiales y recursos humanos, el equipo y espacio disponibles; ⁴² la otra es la valoración por parte de las instancias correspondientes para lograr una profesionalización del personal que labora en la colección y la ubicación de

la misma en espacios adecuados de trabajo y almacenamiento, además de contar con el material y equipo necesarios que permitan llegar a las metas anteriormente planteadas.

REFERENCIAS

1. Alexopoulos, C. Introducción a la micología. Omega. Barcelona. 1985
2. Aparicio Ozores, G., Salgado Brito, R. Conservación de cepas y fagos de *S. aureus* empleados en fagotipificación. III Seminario de conservación de cepas y colecciones de microorganismos. México 1993.
3. Baker, F. Manual de técnica bacteriológica. Acribia. España. 1990.
4. Bonifaz, A. Micología médica básica. Ed. Méndez. México. 1990.
5. Buchanan, R. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. The William & Wilkins Company. Baltimore. 1975.
6. Carrillo, B., Velázquez, M., Echániz, A. Colección de muestras de *St pneumoniae* aislados de niños menores de 5 años. III Seminario de conservación de cepas y colecciones de microorganismos. México 1993.

7. Castro, H., Teixeira, P., Kirby, R. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. Appl. Microb. Biotech. 1995.
8. Cruz Jiménez, G., Segura Ramírez, P., Sáinz Montoya, G.E. Manual de bacteriología clínica. UNAM. México. 1997.
9. Chávez Rivera, E.P., Valencia Hernández, S. Estudio de los métodos de conservación de formas micóticas. FESC-UNAM. México 1997.
10. Deacon, J. W. Introducción a la micología médica. Limusa. México. 1993.
11. Del Río Estrada, C. Las colecciones microbianas, su importancia científica y económica; las colecciones internacionales. III Seminario de conservación de cepas y colecciones de microorganismos. México 1993.
12. De la Cruz, R. Conservación de microorganismos. Infectología. 1982 (8) 519-552.

13. Doronina, N., Trotsenko, Y. Conservation of methylotropic bacteria by lyophilization under dehydration conditions. *Prikl. Biokhim. Mikrob.* 1994 (30) 952-955.
14. Foster, J., Hall, H. Adaptive acidification tolerance response of *S. tiphymurium*. *J. Bact.* 1990 (172) 771-778.
15. Gallardo Ramos, R., Vargas Tapia, A., Quiñones Ramírez, E. Mantenimiento y preservación de cepas microbianas. Secretaría de salud. México 1993.
16. García, E. Ramos, C., Giono, S. Bacteriología médica diagnóstica. ENCP-IPN. México. 1993.
17. Giono Cerezo, S. Marco de referencia. Reuniones previas y antecedentes históricos. III Seminario de conservación de cepas y colecciones de microorganismos. México 1993.

18. Goyal, A., Katiyar, S. Regulation of dextronuclease productivity of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F by the maintenance media. J. Gen. Appl. Micr. 1996 (42) 81-85.
19. Hagemann, M., Wolfel, L., Kruger, B. Alterations of protein synthesis in the *Cyanobacterium synechocystis* sp. PCC6803 after a salt shock. J. Gen Microb. 1990 (136) 1393-1399.
20. Hajek, A., Shimazu, M., Humber, R. Instability in pathogenicity of *Entomophaga maimaga* after long-term cryopreservation. Myc. 1995 (87) 483-489.
21. Harbec, P., Turcotte, P. Preservation of *Neisseria gonorrhoeae* at -20°C. J. Clin. Microb. 1996 (34) 1143-1146.
22. Hernández Vargas, M., Cruz Jiménez, G. Manual de laboratorio de Microbiología General II. FESC-UNAM. México 1994.

23. Hili, P., Evans, C., Vensses, R. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethyl sulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett. Appl. Microb.* 1997 (24) 269-275.
24. Hou-Ching, T. pH dependence and thermostability of lipase from cultures from the AAS culture collection. *J. Ind. Microb.* 1994 (13) 242-248.
25. <http://www.geocities.com/CapeCanaveral/3504/gallery.htm>.
26. Kowca-Haluch, R. Easy and inexpensive diffusion test for detecting the assimilation of aromatic compounds by yeast-like fungi. Part I. Assimilation of dihydroxyphenols. *Chemosph.* 1995 (30) 209-213.
27. Koneman, E. W. *Diagnóstico microbiológico*. Ed. Médica Panamericana. México 1991.
28. Koneman, E. W. *Micología práctica de laboratorio*. 3ª ed. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 1992.

29. Kroll, R., Patchett, R. Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*.
Lett. Appl. Microbiol. 1992 (14) 224-227.
30. Lezama Gutiérrez, R. Colección de hongos entomopatógenos: agentes potenciales de control microbiano de insectos en México. III Seminario de conservación de cepas y colecciones de microorganismos. México 1993.
31. Martínez Cruz, J. Colecciones de microorganismos. Avance y Perspectiva. 1992 (11) 353-357.
32. Martínez García, A., Giono Cerezo, S., Gutiérrez, C. Valdespino, J. Métodos de conservación de *V. cholerae* a mediano y corto plazo. III Seminario de conservación de cepas y colecciones de microorganismos. México 1993.
33. Menon, A., Dave, S. Influence of preservation substrate on iron oxidation ability of various *Thiobacillus ferrooxidans* isolates. Microb. Res. 1996 (151) 225-229.

34. Munguía Pérez J.L. Sugerencias en la organización y manejo de un cepario microbiano. ENCB-IPN. México 1974.
35. Najoumi, S., Smith, D., Rowbury, R. Tolerance to acid in pH 5.0-grown organisms of potentially pathogenic gram-negative bacteria. *Lett. Appl. Microb.* 1995 (21) 359-363.
36. Poston, S., Li Saw Hee, F. Genetic characterisation of resistance to metal ions in methicillin-resistant *S. aureus*: elimination of resistance to cadmium, mercury and tetracycline with loss of methicillin resistance. *J. Med. Microb.* 1991 (34) 193-201.
37. Puchkov, E., Melkozernov, A. Fluorimetric assessment of *Ps. fluorescens* viability after freeze-thawing using ethidium bromide. *Lett. Appl. Microb.* 1995 (21) 368-372.
38. Redkar, R., Lemke, P., Singh, N. Altered gene expression in *Aspergillus nidulans* in response to salt stress. *Myc.* 1996 88 (2) 256-263.

39. Rippon, D. W. *Micología médica*. 3° ed. Interamericana-Mc Graw Hill. México 1990.
40. Rybnikar, A. Long-term maintenance of lyophilized fungal cultures of the genera, *Epidermophyton*, *Microsporum* *Paecilomyces* and *Trichophyton*. *Myc.* 1995 (38) 145-147.
41. Valdespino, J. L. *Manual sobre cólera para personal de salud*. Publicación técnica no. 11. INDRE. México. 1991.
42. Valero Torres, D. *Creación de un cepario en la ENBC*. ENBC-IPN. México 1986.
43. Zenoval, W., Millot, J., Choisy, C., Manfait, M. FT-IR spectroscopic studies on molecular interactions cryoprotectant agents with bacteria. *Biospectroscopy*. 1995 (1) 365-373.
44. Zinnser, H. *Microbiología*. Ed. Médica Panamericana. 18ª ed. Argentina. 1993.

APÉNDICE

FOTOGRAFÍAS DE CEPAS



*Staphylococcus aureus*²⁵



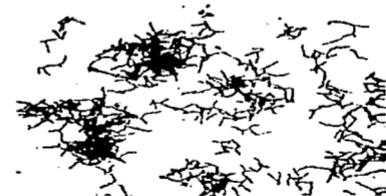
*Corynebacterium diphtheriae*²⁵



*Clostridium tetani*²⁵



*Enterobacter aerogenes*²⁵



*Nocardia asteroides*²⁵

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



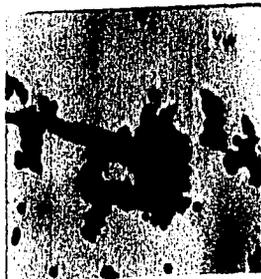
Candida kruzei



Penicillium sp.



Microsporium canis



Aspergillus niger



Rhizopus sp.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN