

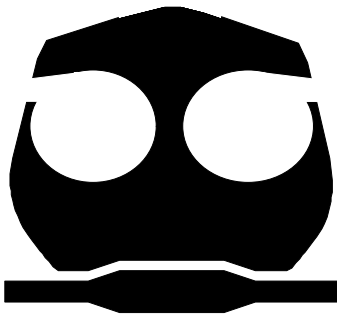


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VALIDACIÓN DE UN METODO MINIATURIZADO PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS,
EMPLEANDO CEPAS AISLADAS DE ENSALADAS FRESCAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
OLGA MARIA DEL S. RIOS VAZQUEZ



MEXICO, D. F.

2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:
RODARTE

Profesor: MARIA DEL CARMEN WACHER

VOCAL:
LOPEZ

Profesor: BEATRIZ DE GUADALUPE SERRANO

SECRETARIO:

Profesor: LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ

1er SUPLENTE:

Profesor: MARTHA GILES GOMEZ

2º SUPLENTE:
HERNANDEZ

Profesor: MARIA DEL CARMEN URZUA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

CEPARIO, LABORATORIO ANEXO 1C, EDIFICIO A, DEPARTAMENTO DE
BIOLOGIA, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

BIBLIOTECAS DE LA FACULTAD DE QUIMICA

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ
CHAVEZ

SUPERVISOR TECNICO:

QFB. MARIA ANTONIETA SILVA

SUSTENTANTE:

OLGA MARIA DEL S. RIOS VAZQUEZ

**Escuchad, cielos y hablaré;
Y oiga la tierra los dichos de mi boca.
Goteará como la lluvia mi enseñanza;
Destilará como el rocío mi razonamiento;
Como la llovizna sobre la grama,
Como las gotas sobre la hierba.**

Deuteronomio 32:2-3

AGRADECIMIENTOS:

Gracias es una de las palabras que es tan pequeña y a la vez tan grande, que involucra un sin fin de cosas maravillosas, que sale de nosotros como un anhelo, un deseo, una emoción, una llamada, una lagrime, una sonrisa, una mirada, un abrazo, un beso, un sentimiento, un sueño y es sin lugar a dudas la mejor forma de expresar nuestro sentir y nuestro aprecio hacia las personas que valoramos.

Gracias a la Facultad de Química por ser mi segunda casa y cobijarme en ella durante mi carrera, por recibirme todos los días muy temprano y despedirme muy tarde, por que entre sus aulas yo encontré muchos amigos, grandes maestros, pero sobre todo un inmenso conocimiento.

Un agradecimiento muy especial a la gente del Cepario (Roy, Anto, Lau y Rafa) que durante mi estancia ahí, me brindaron sus consejos, su apoyo y sobre todo su ayuda y amistad.

Gracias a Deny por todos los años de amistad que me has regalado, por tu cariño, apoyo y comprensión; gracias por ser parte de mi familia, por todas las cosas que pasamos juntas dentro y fuera de la facultad, en verdad te agradezco mucho todo lo que significas para mí.
Te quiero mucho!

Gracias a Alejandra Gómez por regalarme tu amistad en tan poco tiempo, por demostrarme tu apoyo y su cariño, gracias por los domingos futboleros, tus palabras de ánimo, y todos y cada uno de los detalles que has tenido para conmigo.

Gracias a Sandra Chirino por las interminables horas de platica, por el apoyo con el materia para la tesis, por tu compañía, por la paciencia y por regalarme tu cariño y amistad

Y gracias también a Laura Ramírez, René De los Ríos, Fabis, Cristina, Sandra (prima), Itandegüi, Lizeth, Tabata, Luis (Suri), Alex Palacios, Rafael Figueroa, Belem, José Antonio Arcos, Agustín Reyó, Lucia Cornejo y a toda la gente que creyó en mí y que me hace falta mencionar pero que están presentes en mi corazón... a todos ellos gracias!.

DEDICATORIAS:

A DIOS, por que sin Él nada podríamos hacer, por darme su amor y permitirme refrescar mi alma en esos inagotables momentos de refrigerio a lo largo de mi vida al convertirse en mi Padre, mi amigo, mi hermano, mi consuelo, mi refugio, mi guía y mi todo. ¡Gracias Señor!

A mis padres: Germán Ríos y Olga Vázquez por su infinito amor, apoyo y comprensión, por hacer el gran esfuerzo de darme una carrera universitaria y hacer este sueño realidad, por estar conmigo en días de felicidad y tristeza, por enseñarme con sus ejemplos que todo es posible si uno quiere hacerlo y sobre todo por ser el pilar en la base de mi educación y hacer de mi lo que ahora soy.

A mis hermanos: Raymundo y Daniel por su constante cariño y apoyo, por vivir conmigo los momentos de mayor felicidad y tristeza, por sus palabras de aliento en momentos de desolación o por sus ímpetus en los momentos de dicha, por sus regaños, por compartir conmigo el anhelo de ver realizada una meta mas en mi vida, por todas esas discusiones, esos ratos de ocio, los juegos, los viajes, las películas, las cenas, las quincenas, el fútbol y gracias sobre todo por ser parte de mi.

A mis abuelas: Columba González[†] y María Luisa Sotomayor por su incomparable cariño y por todos los consejos que a lo largo de su vida supieron y han sabido ofrecerme en momentos clave para tomar decisiones importantes. Gracias por darme su invaluable amor sin esperar nada a cambio.

(Columbita aunque ya no estas conmigo físicamente sabes que esta tesis es tuya, te amo Abue!)

A mis asesores: Luciano Hernández y Antonieta Silva, por la inmensa dicha de permitirme trabajar en este proyecto con ellos, por la confianza que depositaron en mí y sobre todo por los momentos que han compartido conmigo. Gracias por sus consejos, por su comprensión, por el tiempo que le dedicaron a este trabajo y por su amistad. En verdad no hay palabras para decirles GRACIAS.

A César Vázquez por toda su ayuda, apoyo, cariño, amor y comprensión, por darme esa fuerza y sostener mi brazo en las caídas, gracias por tomar los riesgos y enseñarme una vida de compromiso y gracias por ese empujoncito que me das siempre que lo necesito.

Al Dr. Alberto Vázquez, por demostrarme que las mejores cosas de la vida vienen en porciones pequeñas y se encuentran en cosas insignificantes, por su entrañable amistad, comprensión, cariño, amor y apoyo, gracias por ser la persona mas ruidosa cuando pienso en mis problemas, el mas buenito cuando me ha hecho desesperar, el mas ocupado a la hora de dormir y por transformarme cuando siento y veo el mundo en contra mía... gracias por acompañarme a lo largo de toda una vida con el corazón y el pensamiento y mil gracias por recordarme que el éxito esta constituido por la paciencia y el esfuerzo diario. Te quiero mucho y mil gracias Doc!!

A Rodrigo Conca por hacer mi estancia en el Cepario más amena y divertida, por enseñarme que el verdadero valor de la amistad esta en el escuchar, millones de gracias por todos aquellos momentos que hemos pasado juntos, por tu constante ayuda, por compartir tus sueños y alegrías conmigo, por tus consejos, por tu apoyo y confianza, por todos aquellos destellos de alegría que me regalaste en mucho tiempo y lo mas importante: gracias por permitirme ser tu amiga. Te quiero mucho Roy!!!

CONTENIDO.

1. Introducción.

1.1 Generalidades

1.1.1 Intoxicaciones e infecciones

1.2 Importancia de la identificación bacteriana para la salud y la industria.

1.3. Características de los microorganismos con los que se trabajara en la experimentación

1.3.1 *Salmonella*

1.3.2 *Shigella*

1.3.3 *Staphylococcus aureus*

1.3.4 *Serratia*

1.3.5 Hongos y Levaduras

1.3.6 Mesofilos aerobios

1.3.7 Coliformes totales

1.4 Métodos para identificación bacteriana

1.4.1 Pruebas bioquímicas (biotipificación) y fundamento de estas pruebas.

1.5 Serotipificación

2. Justificación

3. Objetivo general

3.1 Objetivos particulares

4. Equipo, material y reactivos

5. Metodología

5.1 Procesamiento de ensaladas

5.1.1 Determinación de microorganismos coniformes totales

5.1.2 Determinación de microorganismos mesofilos aerobios

5.1.3 Determinación de Hongos y Levaduras

5.1.4 Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

5.1.5 Aislamiento de *Serratia sp*

5.1.6 Determinación de *Salmonella* y *Shigella*

5.2 Caracterización de cepas (Método convencional o Estándar de oro de pruebas bioquímicas y Micrométodo)

5.2.1 Identificación bacteriana por Estandar de oro

5.2.2 Identificación bacteriana por Micométodo

5.2.3 Preparación de placas de microtitulación

6. Resultados

6.1 Mesófilos aerobios

6.2 Cuenta de coliformes totales

6.3 Hongos y levaduras

6.4 *Staphylococcus aureus*

6.5 *Salmonella-Shigella* y *Serratia*

6.6 Comparación de las pruebas bioquímicas obtenidas por los métodos.

7. Discusión de resultados

7.1 Comparativo general

7.2 Identificación bacteriana por ambos métodos

8. Conclusiones

9. Referencias bibliográficas

10 Anexos

10.1 Anexo 1. Elaboración de sustratos bioquímicos empleados en el micrométodo

10.2 Anexo 2. Elaboración de reactivos reveladores

10.3 Anexo 3. Fundamento de medios de cultivo.

1. INTRODUCCIÓN

La familia *Enterobacteriaceae* es un grupo de microorganismos de origen intestinal pero también que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, por lo que pueden ser aislados de tierra, agua y vegetales entre otros. Por otro lado se ha determinado que este grupo de microorganismos pueden ser localizados en alimentos por falta de higiene y ser la causa de problemas gastrointestinales o septicemias.^{1,2}

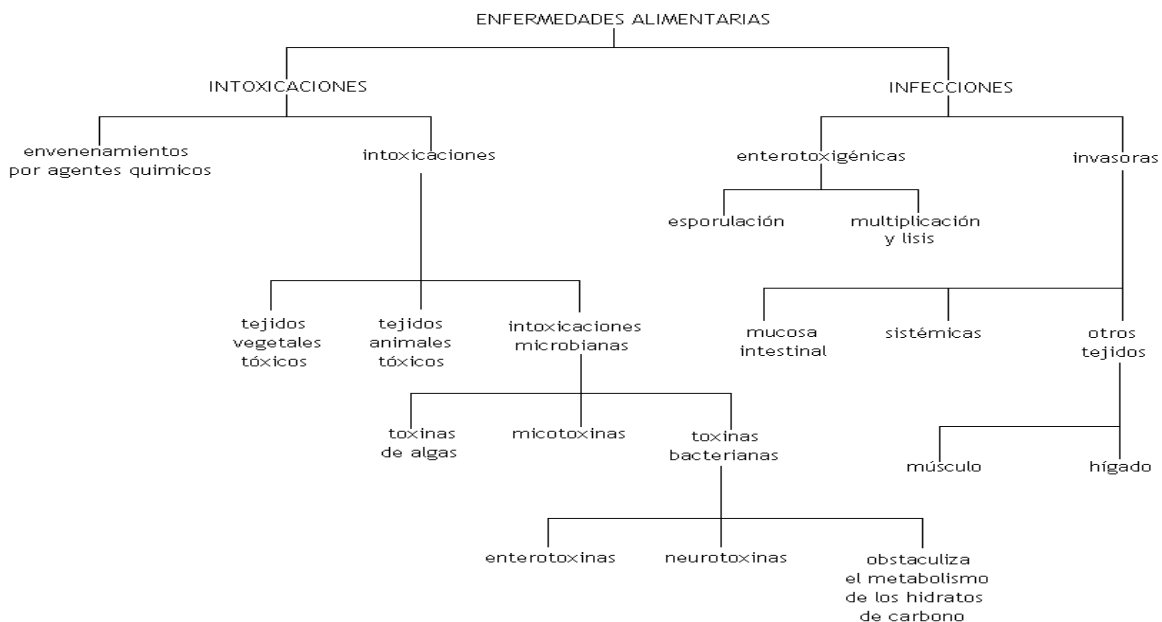
Actualmente en el consumo de la comida rápida y la demanda de alimentos con un alto valor nutritivo y bajo costo, las ensaladas vienen a ser uno de los principales alimentos consumidos debido a que pueden prepararse en la vía pública. Además ofrecen ciertas ventajas al consumidor, como la facilidad para conseguir las, la posibilidad de comerlas de inmediato, su apariencia apetitosa, un valor nutritivo alto y un costo relativamente bajo. Uno de los inconvenientes que presentan este tipo de alimentos es la falta de limpieza con la que son preparados ya que muchas veces estos vegetales no son desinfectados. De ahí la importancia de realizar un control a este tipo de alimentos, en este caso ensaladas que se elaboran en lugares establecidos.

El aislamiento e identificación de los agentes patógenos en ocasiones suele ser tardado y costoso sobre todo en alimentos que se preparan y se consumen inmediatamente. Actualmente la importancia de la identificación bacteriana en los alimentos, es debida a la frecuencia de las enfermedades infecciosas cuyo agente etiológico es el de tipo bacteriano. Para disminuir costos y hacer la identificación más rápida, actualmente se usan sistemas automatizados o semiautomatizados, porque entre otras ventajas que presentan estos sistemas esta la identificación más rápida, además de un mayor número de pruebas.³⁷

1.1 Generalidades

El término “enfermedades transmisibles por alimentos” (ETA), es aplicado a las enfermedades producidas por la ingestión de toxinas elaboradas por microorganismos, así como para designar a aquellas otras debidas a la infección del hospedero a través del tracto intestinal. Las intoxicaciones alimentarias son consecuencia de un envenenamiento químico o de la ingestión de una toxina (intoxicación). La toxina se puede encontrar de forma natural en ciertas plantas o animales o ser un producto metabólico excretado por un microorganismo. Cuando se habla de una intoxicación alimentaria se alude a las enfermedades causadas por la presencia de una toxina bacteriana que se ha originado en el alimento. La expresión de una infección alimentaria se refiere a las enfermedades originadas por la entrada de bacterias en el organismo por ingestión de alimentos contaminados y a la reacción del organismo provocada por la presencia bacteriana o por sus metabolitos (Figura 1).¹

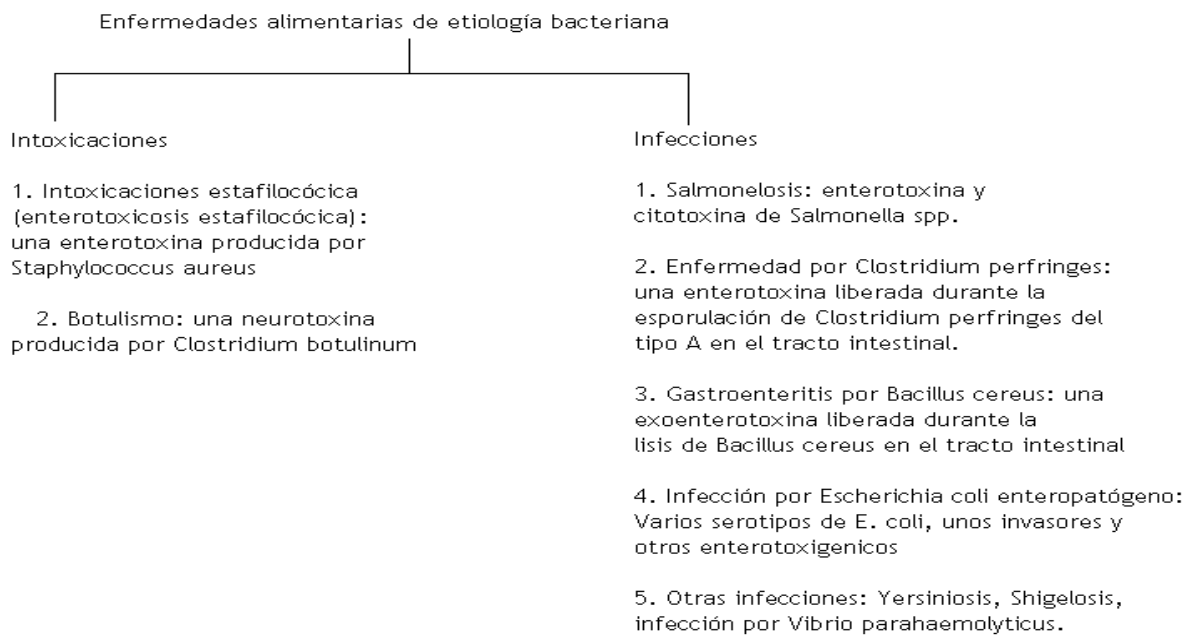
Figura 1. Clasificación de las enfermedades alimentarias.¹



Las infecciones alimentarias señaladas en la Figura 1 se pueden dividir en dos tipos: 1) aquéllas en las que los microorganismos patógenos no necesariamente se multiplican en el alimento, sino que el

alimento solo actúa como vehículo, siendo éste el caso de microorganismos patógenos como los que producen la tuberculosis, la difteria, las disenterías, la fiebre tifoidea, el cólera, la hepatitis infecciosa, la fiebre Q, etc., y; 2) aquellas en las que el alimento puede servir de medio de cultivo para que los microorganismos patógenos se multipliquen en él y alcancen cifras que aumentarán la posibilidad de que el consumidor del alimento se infecte; este tipo de enfermedades se incluyen las producidas por las especies de *Salmonella* sp, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) Figura 2. Es probable que las infecciones alimentarias del segundo tipo sean más explosivos que los brotes originados por otros patógenos intestinales.¹

Figura 2. Ejemplos de bacterias responsables de la producción de intoxicaciones e infecciones alimentarias.¹



1.1.1 Intoxicaciones e infecciones

Los microorganismos presentes en la superficie de las hortalizas no solo incluyen los correspondientes a la microbiota habitual de la superficie, sino también a los procedentes del suelo y del agua.^{1,2}

La flora habitual de las hortalizas incluye bacterias así como hongos y levaduras pertenecientes a distintos géneros. Sin embargo, la microflora varía considerablemente dependiendo del tipo de hortaliza, de las condiciones ambientales, de la época del año y de que crezcan o no cerca del suelo. Las bacterias que pueden encontrarse en las hortalizas en el momento de la cosecha son tanto las Gram- positivas como las Gram-negativas. Sin embargo, la forma en que se almacenan las hortalizas influye en el desarrollo subsiguiente de ciertos grupos microbianos.^{13, 32}

Se ha calculado que una cuarta parte de la totalidad de los alimentos que se recolectan se alteran antes de ser consumidos. Las hortalizas frescas se suelen alterar durante su almacenamiento y transporte, a diferencia de los demás alimentos, éstas después de su recolección conservan su viabilidad durante un tiempo prolongado.^{1,2}

Durante su recolección, tan pronto como se colocan en cajas, canastos, cestas o carretillas, las hortalizas están expuestas a la contaminación mutua y a la procedente de los envases o personas que los manipulan.^{1, 2, 32}

Durante su transportación al mercado o a la planta donde serán tratadas, las lesiones por causas mecánicas que experimentan pueden aumentar la posibilidad de podredumbre y es posible que en las mismas crezcan microorganismos. El lavado de las hortalizas tiende también a transmitir los microorganismos responsables de las alteraciones desde los alimentos dañados a los sanos. El agua que se recupera o se vuelve a utilizar es probable que añada microorganismos, así también el lavado puede humedecer lo suficiente, como para permitir el crecimiento de microorganismos durante el almacenamiento; es por eso que el lavado a las hortalizas con soluciones de detergente o

de agentes germicidas reduce el número de microorganismos de la superficie de estos alimentos. Por último, factores como la manipulación, la abrasión, el pelado, el troceado o el triturado pueden añadir microorganismos contaminantes por medio del equipo utilizado. De hecho cualquier parte del equipo que entre en contacto con el alimento puede ser una importante fuente de contaminación a no ser que haya sido limpiado y desinfectado.^{1, 32, 33}

1.2 Importancia de la identificación bacteriana para la salud y la industria.

Los alimentos juegan un papel muy importante en la transmisión de enfermedades y constituyen un problema de salud pública. Así mismo, éstos son considerados la mayor causa de morbilidad, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, donde son causa frecuente de mortalidad.^{40, 42}

A lo largo del tiempo se han descrito alrededor de 200 enfermedades de transmisión alimentaria, cuyos grupos etiológicos incluyen virus, bacterias, hongos, parásitos, levaduras, productos químicos y toxinas de origen vegetal y animal.^{39, 43}

Dentro de las bacterias causantes de enfermedades de origen alimentario se encuentran *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum* como agentes causales de intoxicación, así como, diversos géneros que son causa de infecciones gastrointestinales como *Salmonella* serotipo Typhi, *Escherichia coli* 0157:H7, que son bacterias descritas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “una nueva y significativa amenaza a la salud pública”.^{3, 34, 35, 37}

Actualmente la importancia de la identificación bacteriana en los centros de salud, es debida a la frecuencia de las enfermedades infecciosas cuyo agente etiológico es el de tipo bacteriano, dicha identificación se realiza por medio de métodos convencionales miniaturizados como lo es la API20E o métodos con sustratos liofilizados, que constan de pruebas bioquímicas para la identificación específica de microorganismos en general.^{36, 38, 44}

La familia *Enterobacteriaceae* es responsable del 30 al 35% de las septicemias, 70% de las infecciones del tracto urinario, infecciones en meninges e infecciones pulmonares e intestinales.^{4, 5, 6, 7, 8, 41}

Así, la tarea preventiva y curativa contra las enfermedades infecciosas, abarca aspectos que van desde la identificación hasta la completa erradicación del agente infeccioso o contaminante mediante el tratamiento antimicrobiano.

Es muy importante la identificación bacteriana en la industria alimentaria, ya que el control microbiológico es un factor determinante en la industria, en los procesos de calidad, elaboración, transporte, almacenamiento, etc.

Por lo que, en la identificación bacteriana:

- Sin ella no es posible precisar el agente etiológico de una enfermedad.
- Ayuda a identificar los problemas de contaminación en productos alimenticios
- Permite posteriormente tomar las medidas necesarias para erradicar al microorganismo infeccioso o contaminante.^{9, 45, 46}

1.3 Características de los microorganismos con los que se trabajará en la experimentación

1.3.1 Género *Salmonella*

El género *Salmonella* se caracteriza por ser bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son quimioorganotróficas, con una capacidad de metabolizar nutrientes por las vías respiratoria y fermentativa, crecen óptimamente a 37° C y fermentan D-glucosa y otros hidratos de carbono con la producción de ácido y gas, son catalasa positiva y no producen Citocromo oxidasa, reducen los nitratos a nitritos, crecen en citrato como única fuente de carbono, generalmente producen ácido sulfhídrico, descarboxilan la lisina y la ornitina y no hidrolizan la urea.^{10, 34}

La nomenclatura del género *Salmonella* ha progresado gracias a la sucesión de esquemas taxonómicos basados tanto en las características bioquímicas y serológicas como en los principios de la taxonomía numérica y de la homología del DNA.

El género *Salmonella* está integrado por microorganismos resistentes que se adaptan fácilmente a las condiciones extremas del medio. Crecen activamente en un amplio intervalo de temperaturas ($\leq 54^{\circ}\text{C}$) y también exhiben propiedades psicotróficas, según se refleja en la capacidad de crecer en alimentos almacenados a temperaturas comprendidas entre 2 y 4°C . Además el acondicionamiento previo de las células a temperaturas bajas puede aumentar notablemente el crecimiento y la supervivencia de este género en los productos alimenticios refrigerados.^{2, 10}

Las fuentes de contaminación en que se puede localizar este microorganismo incluyen el agua, suelo, insectos, heces de animales, carnes crudas, aves crudas, pescados y mariscos crudos. Dentro de los alimentos asociados a la transmisión de este microorganismo, están además de los ya mencionados la carne de res cruda, huevos, leche, y productos lácteos, cocos, salsas y aderezos para ensaladas, mezclas para pasteles, postres rellenos con crema, así como coberturas en polvo, cocoa y gelatina.²⁴

La dosis infectiva es baja, aproximadamente de 15 a 20 células bacterianas, no obstante también depende de la edad y la salud del huésped, así como de los biotipos de las especies del género *Salmonella*.²⁴

1.3.2 Género *Shigella*

El género *Shigella* se caracteriza por ser bacilos Gram-negativos (en cultivos jóvenes producen formas cocobacilares), aerobios y anaerobios facultativos, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, aunque en el aspecto genético son casi idénticas a *E. coli* enteroinvasiva y

están emparentadas estrechamente con las especies de *Salmonella* y de *Citrobacter*. Las especies del género *Shigella* son bacilos inmóviles, se desarrollan bien en medios simples y a temperaturas extremas de 15 y 41° C pero su crecimiento óptimo es a 37.5° C y su pH es entre 7 y 8.⁴⁷

Todas las especies del género *Shigella* fermentan glucosa, pero no suelen producir gas, catalasa positiva, no producen Citocromo oxidasa, reducen los nitratos a nitritos, son citrato negativas. Algunas características importantes que diferencian a estas bacterias de otras entéricas son su incapacidad para fermentar la lactosa (*S. sonnei* la fermenta después de incubación prolongada) o para utilizar el ácido cítrico como fuente única de carbono; no producen H₂S son inhibidas por el cianuro potásico y no sintetizan lisinodecarboxilasa.^{35, 37}

Este género resiste meses en el agua, en hielo e incluso en la ropa contaminada; resisten el fenol al 0.5% durante 3-4 h, pero el fenol al 1% las mata en 30 minutos; mueren a la temperatura de pasteurización y en agua clorada, a las concentraciones usuales que se emplean en las albercas y para beber.^{2, 11, 47}

Este microorganismo, frecuentemente se encuentra en agua contaminada con heces humanas, en alimentos, manos, materia fecal. Los alimentos asociados a este microorganismo son las ensaladas (papa, atún, camarón, macarrón, y pollo principalmente), vegetales crudos, leche y derivados lácteos, así como aves. La contaminación de estos alimentos generalmente es fecal-oral, ya que el hombre consume alimentos que han tenido contacto con materia fecal; en general los alimentos que están en riesgo de estar contaminados con *Shigella* incluyen productos que llevan cualquier tipo de manipulación o que se realiza un tratamiento térmico inadecuado antes de su consumo, de especial manera cuando éstos últimos se consumen crudos.²⁴

La dosis infectiva es de 10 células aproximadamente, pero depende de la edad y la salud del huésped.²⁴

1.3.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un agente patógeno que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad.¹⁵

El género *Staphylococcus* está constituido por células esféricas, no móviles y no esporulados, se presentan como células únicas, en pares, tetradas, cadenas cortas (no más de cuatro células) y en forma de racimos de uvas. Pertenece a la familia *Micrococcaceae*, y son bacterias Gram-positivas, anaerobios facultativos, catalasa positiva. Se diferencian de otros géneros de la familia, en base al contenido de guanina y citosina (G + C) en el DNA, composición de la pared celular (formada de peptidoglicano o mureína y ácido teicoico) y su habilidad de crecer anaeróbicamente y fermentar la glucosa bajo esas condiciones.^{12, 27}

Produce generalmente la enzima coagulasa, fermenta el manitol y otros azúcares, formando ácido pero no gas. El crecimiento ocurre en un amplio rango de temperatura 6.5 a 50° C, siendo el óptimo 30-40° C.^{2, 11}

Este microorganismo se encuentra en el aire, polvo, agua, agua residual, leche y alimentos con alto contenido proteico o en superficies donde se manejan los alimentos, personas y animales, puede crecer en alimentos con alto contenido de sal (por ejemplo jamón) o en alimentos sometidos a tratamientos térmicos que contengan crema (contenido proteico).²⁴

El número de *Staphylococcus aureus* necesario para producir suficiente toxina (1.0 microgramo) que provoque intoxicación en el hombre se ha estimado que debe ser mayor a un millón de UFC por gramo de alimento.²⁴

1.3.4 Género *Serratia*

El género *Serratia* es un género que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y como tal, es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, oxidasa negativo, produciendo colonias que pueden presentar pigmento, especialmente *Serratia marcescens* y *Serratia rubidaea*, las cuales producen un pigmento rojo muy característico llamado prodigiosina.²

Este microorganismo es catalasa positiva, oxidasa negativo, y no móvil. Hay reacciones positivas para la utilización de citrato, produce ácido con glucosa, manitol, inositol, sorbitol, la sacarosa, melibiosa y arabinosa. No produce ácido con ramnosa. Es negativo en la hidrólisis de urea, arginina dihidrolasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, H₂S, e indol.^{2,11}

1.4. Microorganismos de descomposición

1.4.1 Hongos y Levaduras

Los Hongos y Levaduras son organismos muy abundantes y ubicuos en la naturaleza y tienen una gran diversidad de formas y tamaños y pueden vivir en sustratos y condiciones ambientales muy variados. Por ejemplo se pueden encontrar en ambientes con pH de 2 hasta más de 9 con temperaturas que van de 10 a 35°C existiendo algunas especies capaces de crecer en temperaturas menores o mayores a este rango.

Los hongos están formados por células eucarióticas, pueden ser uni o multinucleados; su pared celular está constituida por quitina, mananos, glucanas y celulosa. Son aerobios, heterótrofos, se alimentan por absorción y la reproducción la efectúan, ya sea por mecanismo sexual (teleomorfismo), o por uno asexual (anamorfismo).

La mayoría de los hongos son microscópicos y la unidad anatómica fundamental es la hifa, que en los hongos unicelulares está representada por las levaduras, de forma redonda u oval. ¹¹

Las levaduras se reproducen asexualmente por gemación. Macroscópicamente son muy parecidas a bacterias pero son más cremosas y los colores que presentan son blancos, beige o un poco más oscuros. Algunas son rosadas o rojas porque tienen carotenoides. Microscópicamente suelen ser esféricas, ovoides o alargados y con diámetro mayor a las bacterias.

La clasificación de los hongos es muy compleja y se dividen según su forma de reproducción sexual en cuatro phyla: Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota y Chytridiomycota.^{2, 11}

Los hongos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la microbiota normal de un alimento, o bien como agentes contaminantes de los mismos, provocando el deterioro fisicoquímico de éstos, debido a que dichos microorganismos pueden utilizar en su metabolismo carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos, que originan mal olor, alteración en el color y en el olor, este último aspecto se presenta comúnmente en la superficie de los productos contaminados; presentan además la capacidad para alterar algunos sustratos, permitiendo de esta manera el crecimiento de bacterias patógenas.²⁴

1.5 Microorganismos indicadores

1.5.1 Mesófilos aerobios

Las bacterias mesófilas se refieren a organismos que crecen a temperaturas moderadas (entre 5 y 65° C). Clásicamente, se habla de bacterias mesófilas a aquéllas que crecen a temperaturas comprendidas entre 25 y 40° C.²⁸

El hábitat de estos organismos es muy diverso y cosmopolita: el agua dulce y el agua de mar, las aguas residuales, los vegetales, los animales y el hombre.

Muchas bacterias patógenas para el hombre y los mamíferos tienen un óptimo de crecimiento cercano a 37° C, la temperatura interna mediana de los mamíferos.^{16, 29}

Conforman el grupo más amplio y es el que se aplica como criterio de calidad y provee la mayor información sobre la calidad higiénica de un producto. Es mal llamado, Recuento Total de Bacterias, ya que muchos otros tipos de bacterias no quedan incluidas, porque sus rangos de temperatura óptima de crecimiento son diferentes o el oxígeno les es inhibitorio. Como la lectura se hace contando el número de colonias que aparece en la placa, como producto de la multiplicación a partir de una sola célula bacteriana o de un grupo de ellas, el resultado se expresa en unidades formadoras de colonia U.F.C. / ml o g. ^{12, 28}

1.5.2 Coliformes Totales

El grupo coliforme agrupa a todas las bacterias entéricas que se caracterizan por tener las siguientes propiedades bioquímicas:

- Ser aerobias o anaerobias facultativas;
- Ser bacilos Gram negativos;
- Ser oxidasa negativos
- No ser esporógenas;
- Fermentar la lactosa a 35° C en 48 horas, produciendo una fermentación láctica y gas. ¹⁷

Las bacterias de este género se encuentran principalmente en el intestino de los humanos y de los animales de sangre caliente, es decir, homeotermos, pero también ampliamente distribuidas en la naturaleza, especialmente en suelos, semillas y vegetales.

Los coliformes se introducen en gran número al medio ambiente por las heces de humanos y animales. Por tal motivo suele deducirse que la mayoría de los coliformes que se encuentran en el ambiente son de origen fecal. Sin embargo, existen muchos coliformes de vida libre.

Tradicionalmente se les ha considerado como indicadores de contaminación fecal en el control de calidad del agua destinada al consumo humano en razón de que, en los medios acuáticos, los

coliformes son más resistentes que las bacterias patógenas intestinales y porque su origen es principalmente fecal. Por tanto, su ausencia indica que el agua es bacteriológicamente segura.^{17, 31}

Así mismo, su número en el agua es proporcional al grado de contaminación fecal; mientras más coliformes se aíslan del agua, mayor es la gravedad de la descarga de heces.

Los coliformes son un grupo de bacterias que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo a los humanos. En general, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo. Por su amplia diversidad el grupo coliformes ha sido dividido en dos grupos: coliformes totales y coliformes fecales.

El grupo coliforme está formado por los siguientes géneros:

- *Escherichia*
- *Klebsiella*
- *Enterobacter*
- *Citrobacter*

No todos los autores incluyen al género *Citrobacter* dentro del grupo coliforme.^{14, 31}

Coliformes fecales

Se define como coliformes fecales a aquellos que fermentan la lactosa a 44,5 – 45,5 °C, análisis que permite descartar a *Enterobacter*, puesto que ésta no crece a esa temperatura. Si se aplica este criterio crecerán en el medio de cultivo principalmente *Escherichia coli* (90%) y algunas bacterias de los géneros *Klebsiella* y *Citrobacter*. La prueba de coliformes fecales positiva indica un 90% de probabilidad de que el coliforme aislado sea *E. coli*.

Las coliformes son una familia de bacterias que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo a los humanos por la mayor especificidad del ambiente intestinal que Coliformes totales. La presencia de bacterias coliformes en el suministro de agua es un indicio de

que el suministro de agua puede estar contaminado con aguas negras u otro tipo de desechos en descomposición. Generalmente, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo.³¹

El aislamiento de esta bacteria en el agua da alto grado de certeza de contaminación de origen fecal, alrededor del 99%. No es absoluta porque se han aislado cepas de *E. coli* que no tienen origen fecal, pero es un grado de certeza más que razonable para certificar contaminación con ese origen.

Sin embargo, el aislamiento de este microorganismo no permite distinguir si la contaminación proviene de excretas humana o animal, lo cual puede ser importante, puesto que la contaminación que se desea habitualmente controlar es la de origen humano. Esto no significa menospreciar la de origen animal, especialmente dada la existencia de zoonosis, enfermedades que son comunes al hombre y animales, que también se pueden transmitir por el agua.¹⁴

1.6 METODOS PARA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

1.6.1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y FUNDAMENTO DE ESTAS PRUEBAS.

La identificación es el uso de pruebas bioquímicas para caracterizar e identificar a las bacterias hasta especie, utilizando sustratos o poniendo de manifiesto la presencia de productos metabólicos específicos.

La identificación microbiana se da en dos pasos:

1°. Pruebas primarias: con las cuales se puede determinar la familia, o incluso el género a la que pertenece un microorganismo aislado. Las pruebas primarias involucran tinción de Gram, morfología, pruebas de la catalasa, reacción de oxidasa, y pruebas óxido fermentación de la glucosa, crecimiento en aerobiosis y anaerobiosis y movilidad, reducción de nitratos.^{25, 30}

2°. Realización de pruebas secundarias y terciarias a efectos de determinar la especie. Estas dependerán de familia o género determinado (Ej.: producción de pigmentos, producción de indol a partir de triptofano, producción de coagulasa, de fenilalanina desaminasa, etc.).

Si bien existen una gran variedad de pruebas bioquímicas empleadas con fines de identificación, a continuación se enumeran las más utilizadas.^{25, 30}

Oxidasa:

Está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que actúa en la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.²¹

Catalasa:

Es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. El peróxido de hidrógeno es uno de los productos oxidativos finales en el metabolismo aerobio de los carbohidratos, si se acumula es letal para las células bacterianas.⁸

Gluconato:

Determina la capacidad de un organismo de oxidar el ácido glucónico, su única fuente de carbono, en los compuestos reductores es el 2-cetogluconato.²¹

Bilis Esculina:

Determina la facultad de un organismo de hidrolizar el glucósido esculina en esculetina y glucosa en presencia de bilis.

Utilización de carbohidratos:

La utilización de carbohidratos por los microorganismos se puede dar por dos vías, la fermentativa y la oxidativa. La fermentativa se lleva a cabo en condiciones de anaerobiosis y la oxidativa en condiciones de aerobiosis.

La fermentación de carbohidratos: determina la capacidad de un organismo de fermentar un hidrato de carbono específico incorporado al medio básico, produciendo ácido y gas.⁸

Algunos ensayos combinados:

AGAR HIERRO DE KLIGLER.

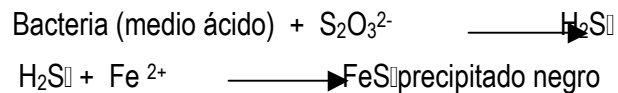
En este medio se pueden ver varias condiciones enzimáticas de las bacterias. Está compuesto principalmente por dos azúcares en distinta proporción, glucosa al 0.1% y lactosa al 1%, además este medio contiene tiosulfato sódico, citrato férrico y rojo de fenol como indicador de pH. Para estudiar el comportamiento de las bacterias en aerobiosis y anaerobiosis, la siembra en este cultivo se deberá realizar tanto en la superficie del agar, como en la profundidad del mismo.²¹

La información que nos proporciona este medio es la siguiente:

- **Fermentación de la glucosa:** se presenta un viraje a color amarillo en el fondo. Si las bacterias fermentan sólo la glucosa, en la superficie la utilizará por vía respiratoria, donde la tensión de oxígeno disminuye lo suficiente, empleará una pequeña porción por la vía fermentativa. Esto producirá una pequeña cantidad de ácidos que serán neutralizados por las aminas derivadas de la descarboxilación oxidativa de las proteínas, por lo que el medio mantendrá su color rojo en la superficie, al no haber cambio de pH. En el caso contrario, las bacterias crecidas en la profundidad emplearán desde el principio la glucosa por la vía fermentativa, produciendo ácidos que no serán neutralizados, provocando un descenso del pH y el color del medio en el fondo del tubo cambiará a amarillo.
- **Fermentación de lactosa:** presencia de viraje a color amarillo en la superficie. Si las bacterias fermentan la lactosa, los ácidos producidos modifican el pH de la superficie del medio. En este caso las aminas no son capaces de neutralizar la cantidad de ácidos

producidos en esta fermentación, ya que la lactosa se encuentra en el medio a mayor concentración que la glucosa. Por lo que el color del medio en la superficie cambiará a amarillo.

- **No- fermentación de los azúcares:** Si la bacteria es aerobia estricta, el medio permanecerá de color rojo. En este caso, los azúcares son respirados, degradándose completamente hasta CO₂, que se elimina y no modifica el pH.
- **Producción de gas en la fermentación:** aparición de burbujas, rotura o elevación del agar del fondo del tubo.
- **Producción de ácido sulfhídrico:** ocurre la misma reacción que en la prueba de SIM, la cual es:



LIA (Agar Hierro Lisina)

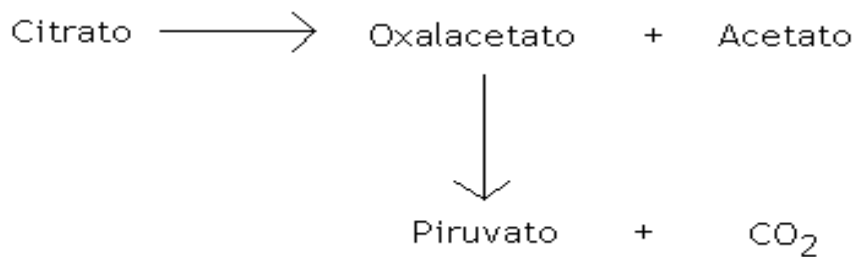
Permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de ácido sulfhídrico y es más sensible que TSI (triple azúcar Hierro) para la detección de H₂S.⁹

CITRATO.

En esta prueba se puede determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, por ello se provoca una alcalinización del medio. Entre las enterobacterias, que se encuentran dentro de estas características, se encuentran los siguientes géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*,

Citrobacter, algunas especies de *Salmonella*. Sin embargo *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* serotipo *Typhi*, *Salmonella paratyphi*, son incapaces de crecer con estos nutrientes.

Se cultiva el microorganismo en agar Citrato de Simmon's, el cual contiene citrato de sodio como única fuente de carbono, fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno y azul de bromotimol como indicador de pH. Las bacterias que logran multiplicarse en este medio, son aquellas capaces de metabolizar el citrato, y al hacerlo liberan iones amonio. Esta liberación de iones básicos, junto con la combinación del citrato, generará una fuerte alcalinidad del medio que será aparente por un cambio de color del indicador de pH, de verde a azul. ^{18, 21, 25}



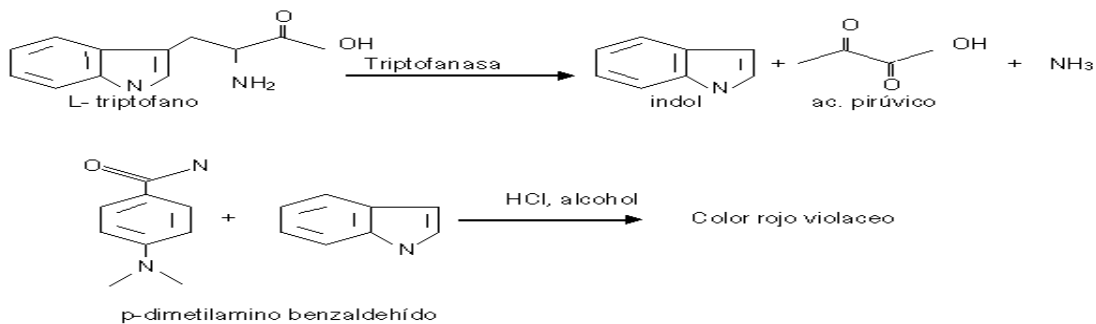
INDOL

Aquí se puede observar la presencia de la enzima triptofanasa en bacterias, la cual es capaz de degradar el aminoácido triptofano a indol, que es el compuesto que se detecta en este ensayo. Para realizar esta prueba es necesario que la bacteria se cultive durante 24 – 48 horas en un caldo de triptona con NaCl al 0.5 % (este digerido de proteínas animales es especialmente rico en triptofano). Para la posterior detección del indol se utiliza el reactivo de Kovacs que se puede preparar utilizando la siguiente formulación:

- Alcohol amílico o isoamílico (o alcohol butírico).....150 ml
- p- dimetilamino-benzaldehído.....10 g
- HCl concentrado.....50 ml

Se disuelve primero el aldehído en el alcohol, agregando después lentamente a esta mezcla el ácido. Para el control de calidad del reactivo se puede utilizar cultivos conocidos. Las más convenientes son *Escherichia coli* (indol +) y todas las especies de *Klebsiella* (indol -). Si la bacteria posee la enzima triptofanasa, al añadir 5 gotas del reactivo de Kovacs al medio, se producirá un anillo de color rojo en la superficie del caldo y la prueba será considerada positiva. Si esto ocurre después de 24 horas, la prueba se considera completa, pero si es negativo deberá incubarse otras 24 horas y repetirse la prueba. Por ello es conveniente hacer siempre la prueba no en el tubo inclinado sino en una porción de unos 2 ml que se retira de él asépticamente. ^{18,21}

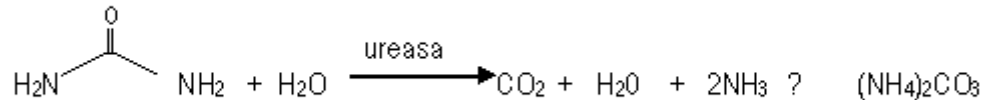
La reacción presente en esta prueba es la siguiente:



UREA.

Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado.

Se cultiva el microorganismo en agar inclinado de urea de Christensen. Este medio se complementa después de esterilizado en autoclave con 50ml/l de urea estéril. Ésta será degradada por aquellos microorganismos capaces de producir el enzima ureasa. Esta degradación produce amoniaco que hará variar el color del indicador de amarillo a rojo, poniéndose así de manifiesto la actividad ureasa. Para revelar el resultado de esta prueba es importante tener en cuenta el tiempo de incubación ya que especies de *Proteus* vuelven alcalino el medio poco después de la inoculación y sus resultados deben ser leídos en las primeras 2-6 horas, mientras que *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae* tienen actividad ureasa dentro de las 24-48 horas de incubación. ²²



ROJO DE METILO Y VOGES- PROSKAUER (RMVP).

Estas dos pruebas forman parte del IMViC y permiten la diferenciación dentro de las enterobacterias del grupo coli y aerógenas. Las enterobacterias son anaerobios facultativos que utilizan la glucosa en dos fases: primero la metabolizarán aerobiamente consumiendo rápidamente el oxígeno del medio, en segundo lugar, continuar metabolizándola por vía anaerobia. Esto se puede presentar de dos formas:

- **Fermentación ácido mixta:** la realizan las bacterias del grupo E coli y los productos finales son ácidos orgánicos (fórmico, láctico, succínico) que provocan un fuerte descenso del pH inicial del medio. Pueden detectarse por el viraje del indicador de rojo de metilo que permanece amarillo por encima de pH 5.1 y rojo por debajo de 4.4.
- **Fermentación butilén glicólica:** realizada por la bacteria del grupo *Klebsiella-Enterobacter*. Los productos finales son compuestos neutros como el butanodiol y el etanol,

produciéndose acetoina como intermediario que podrá ser detectado añadiendo al medio KOH y alfa-naftol que reaccionan con este compuesto produciendo un color rojo característica.

Para la realización de estas dos pruebas se cultiva el microorganismo en caldo RMVP y se inocula a 30° C durante un periodo de tres días como mínimo y 5 como máximo. Al revelar las pruebas, se separa el cultivo en dos porciones de unos 2.5 ml que servirán para cada uno de los ensayos.

Rojo de metilo: a uno de los tubos se le añade unas gotas (4-5) de solución indicadora de rojo de metilo. Se homogeniza y se observa la coloración. Se considera negativa si vira al rojo y negativa si permanece amarillo.²¹

Voges-Proskauer: a la otra porción del cultivo se le agrega:

- 0.6 ml del reactivo A de Voges-Proskauer (alfa-naftol 5% en etílico absoluto). El medio adquiere un aspecto lechoso.
- 0.2 ml del reactivo B de Voges-Proskauer (KOH 40%). Desaparece el aspecto lechoso y se agita fuertemente.

Si la prueba es positiva, antes de 5 minutos aparece un color rosado-violáceo, más o menos intenso, que se inicia en la parte superior del tubo. Si la prueba es negativa no aparece coloración alguna.¹⁸

21

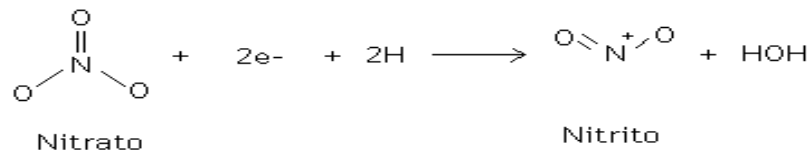
REDUCCION DE NITRATOS

La reducción del nitrato (NO_3) en nitrito (NO_2) y en gas nitrógeno (N_2), tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo realiza su respiración con el nitrato, el que sirve como aceptor de electrones. La mayoría de las bacterias aerobias son anaerobias facultativas y sólo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno. En la reducción del nitrato, los citocromos

bacterianos transportan electrones a moléculasceptoras específicas. A través de esta prueba se determina si el microorganismo es capaz de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre.^{8,21}

Esta reacción se revela mediante dos reactivos. Reactivo A (α-naftilamina y ácido acético 5N) más el reactivo B (ácido sulfanílico y ácido acético 5N). Un resultado positivo lo da un color rojo, que indica la presencia de nitritos. La ausencia de color después de haber adicionado los reactivos puede indicar que los nitratos no han sido reducidos (una verdadera reacción negativa) o que han sido reducidos a productos distintos de los nitritos, como óxido nitroso (N₂O), óxido nítrico (NO), nitrógeno molecular (desnitrificación). Dado que los reactivos detectan sólo nitritos, este último proceso llevaría a una lectura falsa negativa. Por lo tanto, es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones negativas.^{18,21}

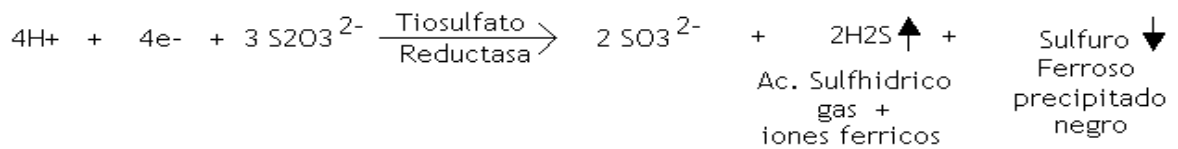
Los iones zinc reducen los nitratos a nitritos, y el desarrollo de un color rojo tras adicionar el polvo de zinc indica la presencia de nitratos residuales y confirma la reacción negativa verdadera, pero si no aparece el color rojo tras haber adicionado el polvo de zinc confirma la prueba positiva.



PRODUCCIÓN DE ACIDO SULFIDRICO

Esta prueba determina si se ha liberado H₂S por acción enzimática produciendo una reacción visible de color negro. La producción de H₂S a partir de tiosulfato que se reduce a sulfuro de hidrógeno en presencia de un donador de hidrógeno por bacterias que poseen la enzima específica, el H₂S

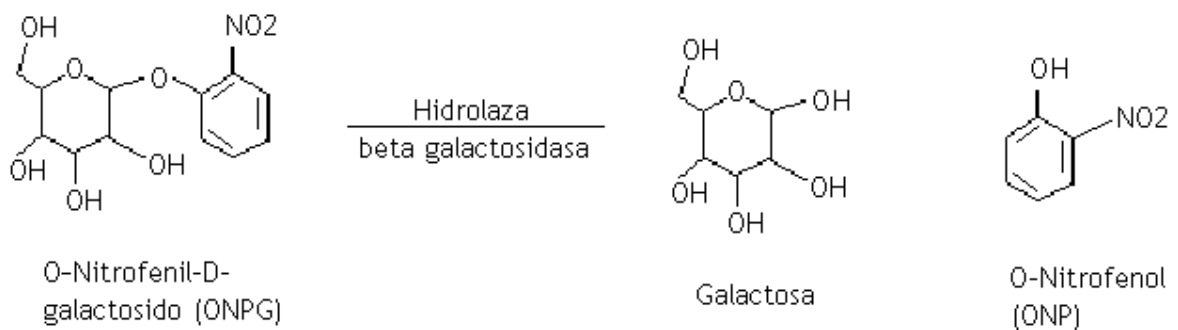
reacciona con el hierro (sulfato ferroso) del medio, dando un precipitado negro del sulfuro ferroso. Siendo el sulfuro de hidrógeno un gas incoloro, se debe incluir en el medio un indicador para su detección. El tiosulfato de sodio es la sustancia incluida más a menudo en los medios a fin de proveer los átomos de azufre requeridos por las bacterias para producir el H₂S, el sulfato ferroso es la sal de hierro utilizada que reacciona con el gas H₂S produciendo un precipitado negro que indica una reacción positiva.



β-GALACTOSIDASA

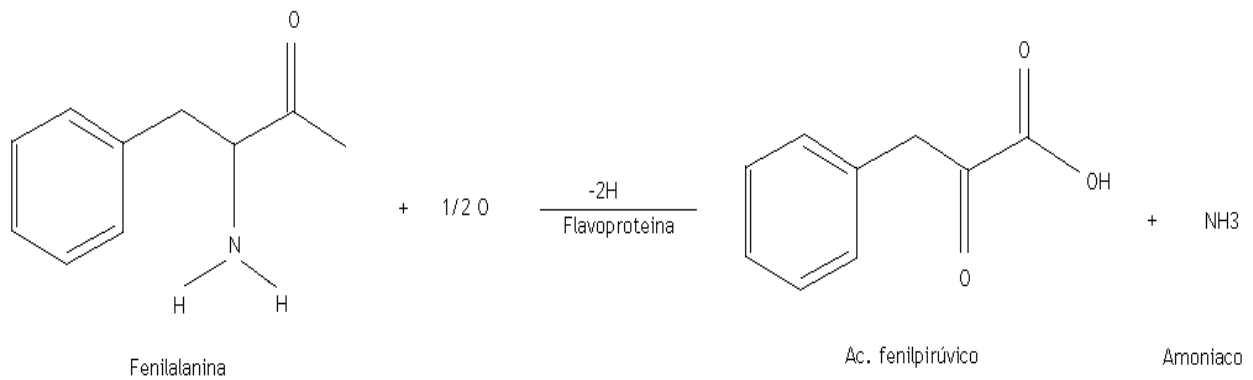
Esta prueba demuestra la presencia o ausencia de la enzima β-galactosidasa utilizando el compuesto orgánico o-nitrofenil-β-D-galactósido (ONPG).¹⁸

La β-galactosidasa es una enzima intracelular vinculada con la hidrólisis (descomposición) de la lactosa y otros β-galactósidos, la lactosa es hidrolizada en galactosa y glucosa. La reacción es positiva cuando se observa un color amarillo por la hidrólisis del ONPG (incoloro) que libera el cromogéno amarillo del o-nitrofenol (ONP).^{21, 25, 30}



FENILALANINA

La fenilalanina es un aminoácido que por desaminación oxidativa forma un cetoácido, el ácido fenilpirúvico. Los géneros *Proteus* y *Providencia* poseen esta enzima, que permite diferenciarlos del resto de las enterobacterias. La prueba se basa en la detección del ácido fenilpirúvico luego del desarrollo del microorganismo en un medio que contiene fenilalanina. Para esto se agrega cloruro férrico que forma un complejo de color verde con el ácido fenilpirúvico que indica reacción positiva. El medio de cultivo no puede contener extractos de carne o peptonas por su contenido variable en fenilalanina.^{18, 25, 30}



DESCARBOXILACIÓN DE ARGININA, LISINA Y ORNITINA

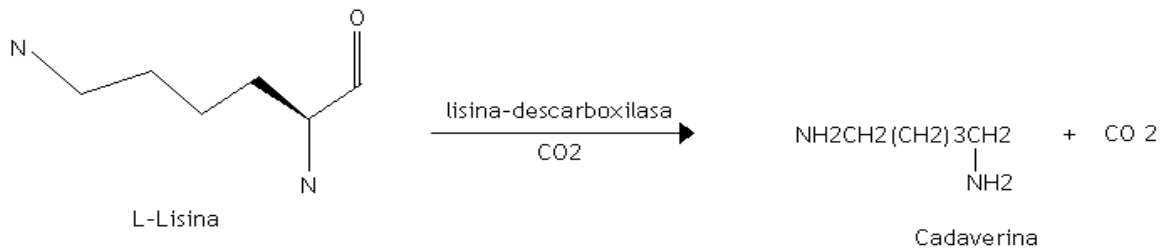
La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de ejercer acción a los aminoácidos en su grupo carboxilo (COOH), dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico.^{9, 18, 21}

Cada descarboxilasa es específica para un aminoácido y la reacción es completa e irreversible. Los aminoácidos ensayados habitualmente son Lisina, Arginina y Ornitina.^{9, 18, 21}

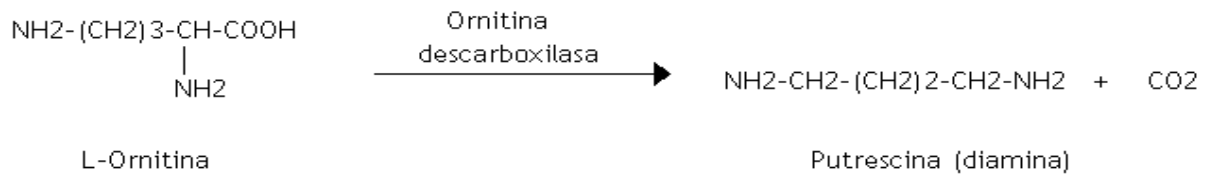
El caldo descarboxilasa de Moeller es el medio base mas común usado para la determinación de las descarboxilasas en las Enterobacterias. Se prepara un tubo con el aminoácido a ensayar y un tubo control sin ningún aminoácido. Se cubren con una capa de aceite mineral (vaselina líquida) para hacer el medio anaerobio e inducir que ocurra la fermentación de la glucosa. Luego si el aminoácido

es descarboxilado, se forman aminas que provocan un retorno al color original del medio o un viraje al alcalino.^{9, 18, 21}

El aminoácido L-Lisina sufre la descarboxilación para dar cadaverina (una diamina) y anhídrido carbónico por acción de la enzima específica lisina-descarboxilasa.^{9, 18, 21}



El aminoácido L-Ornitina es descarboxilado por la enzima Ornitina-descarboxilasa para dar la diamina putrescina y anhídrido carbónico.^{9, 18, 21}



El aminoácido L-Arginina es catabolizado a través de dos sistemas que pueden ocurrir simultáneamente o separadamente. Estos sistemas son los de arginina-dehidrolasa y el de arginina-descarboxilasa. En el sistema de la descarboxilasa la arginina sufre una descarboxilación para dar agmatina y este producto a su vez se desdobla en putrescina y urea mediante la enzima agmatinasa. En el sistema dehidrolasa, la descomposición de la L-Arginina, se produce en dos etapas: primero una descomposición de la arginina en L-citrulina, seguido por un sistema de desdoblamiento de la citrulina. La reacción general produce la formación de L-Ornitina, CO₂ y NH₃.^{9,}



MALONATO

Esta prueba sirve para determinar si un organismo es capaz de utilizar malonato de sodio como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio.

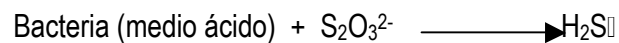
Ayuda a la diferenciación de entre los géneros *Alcaligenes faecalis* (+) de *Acinetobacter* (-); *Arizona* (+) de *Salmonella* (-); Grupos de *Klebsiella-Enterobacter* (+) de *Escherichia coli* (-) y especies de *Serratia* (-).^{18, 21}

Se cultiva el microorganismo en medio malonato. Este medio contiene malonato de sodio como única fuente de carbono, sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno y azul de bromotimol como indicador de pH. Únicamente las bacterias capaces de metabolizar el malonato podrán multiplicarse en este medio y, al hacerlo, se produce un aumento de la alcalinidad que se debe a la formación de NaOH. ^{18, 21}

Una prueba positiva es cuando el medio cambia a color azul claro o azul de Prusia intenso en todo el medio, prueba negativa sino se observa cambio de color (verde) o color amarillo (únicamente fermentación de la glucosa). ^{18, 21}

MEDIO SIM.

Producción de ácido sulfhídrico: En esta prueba se observa un precipitado de color negro en el fondo del tubo. Algunas especies respiradoras anoxibiónticas son capaces de emplear el tiosulfato sódico como aceptor final de electrones en la cadena transportadora. Por lo que este compuesto se reduce a ácido sulfhídrico, que a su vez reacciona con el hierro (Fe^{2+}) presente en el medio formando un precipitado negro de sulfuro de hierro. Los iones Fe^{2+} produciendo los iones Fe^{3+} del citrato férrico y aparecen debido a los cambios en los potenciales redox producidos al someter al autoclave el medio de cultivo. La reacción presente es la siguiente:



Prueba de Indol, ya mencionada.

Prueba de la movilidad: Está prueba nos ayuda a determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se presentan principalmente entre los bacilos aunque existen algunas formas de cocos móviles. El medio SIM permite que esta prueba se realice, gracias a ser un medio semisólido, ya que contiene solamente 3.5 g/l de agar. En estas condiciones, las bacterias móviles producirán un enturbiamiento homogéneo del medio debido a la distribución aleatoria de los microorganismos. Por lo contrario, las bacterias inmóviles permanecerán en la misma línea de la picadura en que se sembraron. Entre las enterobacterias, la movilidad nos permite diferenciar el género *Klebsiella* (-) de las restantes que pueden ser movilidad (+). Dentro del género *Bacillus*, nos permite diferenciar *B. anthracis* (-) de otras especies generalmente (+).^{18, 25}

PRUEBA DE MANITOL.

La manitolasa es un sistema enzimático, en el que el microorganismo puede utilizar el manitol como sustrato; esto mediante reacciones acopladas en las que transforman el manitol en fructosa-6-fosfato. Al utilizar el microorganismo al manitol como sustrato, e incorporarlo al sistema Embden-Meyerhoff-Parnas, que presenta como productos finales ácidos que provocan la disminución del pH en el medio de cultivo, que se detecta mediante el vire del indicador rojo de fenol a amarillo. Se siembra la muestra en agar sal manitol o en caldo manitol rojo de fenol, los cuales son incubados durante 24 horas. Para obtener un resultado más confiable, es recomendable, realizar la prueba en medio líquido, ya que a la vez que se lleva a cabo esta prueba, se obtiene el cultivo líquido necesario para realizar la prueba de la coagulasa. La prueba es positiva cuando el indicador del medio vira a amarillo y negativo cuando conserva su coloración inicial. Bacterias manitol (-), son, dentro de las Enterobacterias; varias especies de quitar esta línea *Proteus* y *Shigella*.²¹

FERMENTACION DE GLUCOSA, LACTOSA Y OTROS CARBOHIDRATOS:

Una de las características taxonómicas que se utiliza para identificar los diferentes géneros de Enterobacterias lo constituyen el tipo y la proporción de productos de fermentación de la glucosa. Se conocen dos tipos generales: la fermentación ácido-mixta y la fermentación del 2,3-butanodiol, etanol, H₂ y CO₂.

La determinación de la capacidad de fermentación de la Glucosa es importante en las primeras etapas de identificación de bacterias quimiótrofas.

Reutiliza un caldo que contiene glucosa (azúcar del cual la mayoría de las bacterias quimiótrofas pueden obtener energía, ya sea por fermentación o respiración), peptona y un indicador de pH que permite detectar la producción de ácidos (característica de la fermentación de la glucosa).

Además de la fermentación se produce gas, ya sea CO_2 sólo o una mezcla de H_2 y CO_2 . Ambos son gases y se detecta por la formación de gas en una campana de Durham presente en el medio. ^{18, 19,}

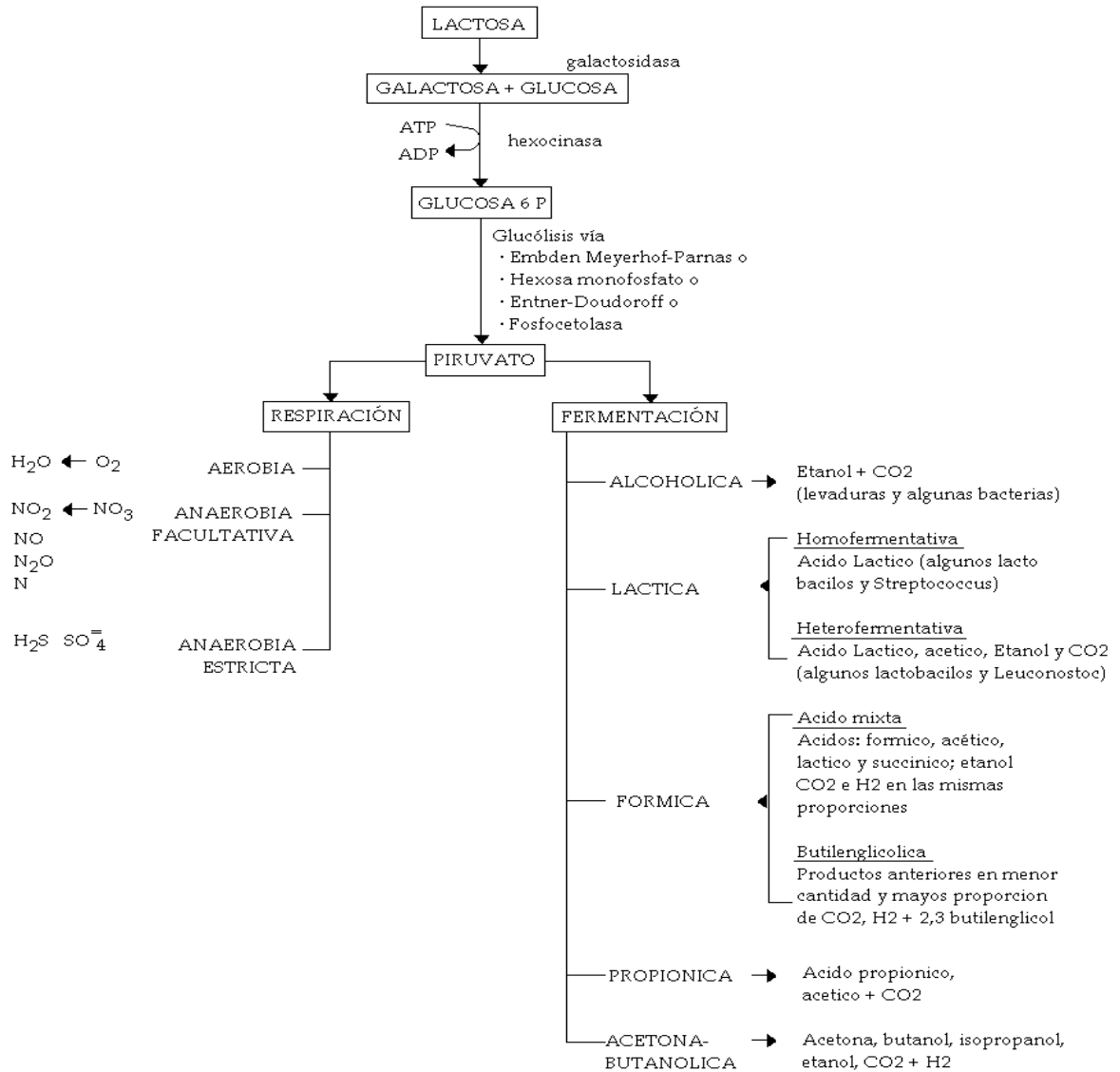
20

La fermentación bacteriana de la lactosa es más compleja que la glucosa. La lactosa es un disacárido compuesto por glucosa y galactosa, conectadas mediante un átomo de oxígeno que constituye lo que se conoce como unión galactósidas. Por hidrólisis se destruye esta unión, liberándose glucosa y galactosa. Para que un microorganismo utilice la lactosa debe estar presente dos enzimas: la β galactosidasa, requerida para hidrolizar la unión β galactósido una vez que el disacárido ha ingresado en la célula. La reacción ácida final proviene de la degradación de la glucosa. ^{18, 19, 20}

La capacidad de fermentar distintos carbohidratos es una característica muy utilizada en la identificación de microorganismos. Esta prueba determina la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido o ácido con gas. Estos hidratos de carbono son lactosa, ramnosa, arabinosa, rafinosa, melibiosa, maltosa, manitol, sorbitol, trehalosa, adonitol, entre otros. La fermentación es un proceso metabólico de oxido-reducción anaeróbico en el cual un sustrato orgánico sirve como el aceptor de hidrógeno final (aceptor de electrones) en lugar de oxígeno. Los productos de la fermentación de los hidratos de carbono depende de varios factores: 1) el tipo de microorganismo que lleva a cabo el proceso de fermentación, 2) la naturaleza del sustrato, 3) a veces, los factores ambientales como la temperatura y la acidez. Las bacterias pueden generar distintos productos finales dependiendo de la vía de fermentación que utilicen: la vía alcohólica, láctica, fórmica, propiónica y la vía acetona-butanólica. ^{8, 20, 25, 26}

Para visualizar la producción de ácidos se utiliza el rojo de metilo que es un indicador de pH con un intervalo entre 6.0 (amarillo) y 4.4 (rojo), y para la acetoína el β naftol e hidróxido de potasio. ^{20, 25}

Figura 3. Transformación de la lactosa y derivación del ácido pirúvico a principales productos de la respiración y fermentaciones bacterianas.



1.7 SEROTIPIFICACIÓN

La tipificación de microorganismos es la identificación mas allá de la especie y en ocasiones se basa en las características antigénicas además de las bioquímicas.

Las bacterias tienen antígenos presentes que son específicos como su huella digital, (serotipo). Los antígenos bacterianos pueden ser moléculas capsulares (K) que consisten en polisacáridos, somáticos (O) que corresponden al lipopolisacárido de la pared de los Gram.-negativos, flagelares (H) que son proteínas llamadas flagelinas.⁷

La estructura antigénica de algunos géneros es tan compleja como en el caso de la *Salmonella* sp., *Escherichia* sp., *Shigella* sp. y *Yersinia*, que presentan una gran variedad de subgrupos determinados por los antígenos presentes. Ejemplo:

Se puede expresar el nombre de una cepa de la siguiente manera:

Género	Especie	Biotipo	Serotipo
Yersinia	enterocolítica	4	03

En una primera identificación se usan sueros polivalentes que determinan la cantidad de antígeno y para la caracterización serológica específica se usan sueros monovalentes dentro de cada tipo de antígeno.

Para la serotipificación de las bacterias, se realiza mediante técnicas de aglutinación en portaobjetos, precipitación y difusión en gel.⁷

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que las enterobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en vegetales, tierra y agua, hemos decidido realizar este estudio haciendo pruebas de plataforma y aislamiento de algunos de los patógenos (*Serratia* sp, *Salmonella* sp y *Shigella* sp y *Staphylococcus aureus*), así como microorganismos de descomposición como hongos y levaduras y microorganismos indicadores como mesófilos aerobios y cuenta de coliformes, presentes en las hortalizas que comúnmente se utilizan para la elaboración de ensaladas. Ya que éstas son un alimento que puede prepararse en la vía pública que además ofrecen ciertas ventajas al consumidor, como son la rapidez con la que se sirven, fáciles de conseguir, posibilidad de consumirlos de inmediato, con apariencia apetitosa que presentan y un valor nutritivo y son económicas. Pero las condiciones higiénicas con las que son preparadas muchas veces no es la aceptable de ahí que pueden ser aislados y detectados varios patógenos. Se ha establecido que los microorganismos encontrados en alimentos por falta de higiene son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, otros microorganismos que no son tomados en cuenta y que pueden ser causa de septicemias o problemas gastrointestinales en personas inmuno-deprimidas son *Serratia rubidaea* y *Serratia plymuthica*.

En este trabajo se hará el estudio a las ensaladas que se expenden en algunos establecimientos de comida rápida de Ciudad Universitaria, para la valoración sanitaria de acuerdo a la NOM-093-1994, además se realizará el aislamiento de bacilos Gram-negativos encontrados en las ensaladas, los cuales serán identificados por medio de un sistema miniaturizado elaborado en la Facultad de Química y comparado con el sistema convencional, esto a su vez permitirá hacer la validación de dicho método y de esta forma se tendrán mas elementos para poder aplicarlo en docencia en los laboratorios de Microbiología de Alimentos, Bacteriología o en investigación.

3. OBJETIVO GENERAL

Validar un método miniaturizado para la identificación de Bacilos Gram-negativos en ensaladas frescas de los comedores de las Facultades de Diseño, Odontología, Química, Arquitectura e Ingeniería de Ciudad Universitaria.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

- ❖ Hacer pruebas a las ensaladas que se expenden en algunos comedores de Ciudad Universitaria para ver la incidencia de microorganismos patógenos.

- ❖ Detectar la posible presencia de *Serratia plymuthica* y *Serratia rubidaea* a partir de ensaladas frescas.

4. EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS

- Equipos: Congelador REVCO (EQUIPAR S. A de C. V.)
Autoclave (Hirayama)
Balanza analítica analytical Plus (OHAUS)
Campana de Flujo laminar (VECO)
Horno de microondas (Panasonic)
Incubadora a 37 °C (Riossa)
Incubadora a 28 °C (Riossa)
Liofilizadora Freeze Dryer 3 (LABCONCO)
Stomacher
Potenciómetro pHmeter 320 (CORNING)
Refrigerador (American)
- Material: Placas de Elisa (Nung Denmark)
Filtros y membranas de 0.45 µm (Millipore)
Puntas de polietileno color amarillo estériles (Rainin Instrument C. A. INC)
Porta puntas (Rainin Instrument C. A. INC)
Micropipeta 50-100 µL Finnpiptette (Labsystems)
Tubos de vidrio de 16x100, 13x100
Microtubos
Cajas petri de plástico 100x15 mm
Papel de estrasa
Vaso de vidrio Pyrex de 150 mL
Matraz Erlenmeyer Kimax 250 ml

Matraz Erlenmeyer Kimax 500 ml

Gradillas

Guantes de látex

Jeringas de 20 mL

Asa bacteriológica

Pipetas Pasteur

Bulbos de plástico

Pipeta graduada de 1, 5 y 10 mL

Mechero de Bunsen

Portaobjetos

- Reactivos: L(+) Ramnosa monohidratada (Merck)
- Rafinosa pentahidratada (Merck)
- Maltosa monohidratada (Merck)
- Melibiosa monohidratada (Merck)
- Dulcitol (Merck)
- L-arabinosa (Difco)
- Salicina (Merck)
- D(+) Xilosa (sigma)
- Lactosa (Bioxon Méx.)
- Sacarosa (Bioxon Méx.)
- D-Dextrosa (glu) anhidra (Q. Industrial Carmona)
- Manitol (Bioxon Méx.)
- Inositol (Sigma)
- Malonato (Merck)

Caldo nutritivo (Bioxon Méx.)

Cloruro de sodio (laboratorio Cepario)

Fosfato de sodio dibásico (Laboratorio Cepario)

Fosfato de sodio monobásico (J. T. Baker)

Fosfato de potasio dibásico (Técnica Química S.A.)

Tiosulfato de sodio (T.J. Baker)

Urea (Merck)

Nitrato de potasio (Tecn. Química)

Tiosulfato de sodio Anhidro (Reasol)

Extracto de levadura (Bioxon)

Sacarosa cristal (J. T. Baker)

Peptona de caseína (Bioxon)

Azul de bromotimol (Tecn. Química)

Rojo de fenol (Merck)

DL-Fenilalanina (Sigma)

L-Ornitina (Sigma)

L-Arginina (Mark Cambar)

Base Moeller (Becton Dickinson)

Lisina (Sigma)

Agar McConkey

Agar Baird Parker

Agar DNAsa

Ortotoluidina

Agar BRV

Agar cuenta estandar
Caldo Lactosado
Caldo Selenito
Caldo tetrionato
Telurito de Potasio
Solucion Yodo-Yoduro de potasio

A todas las ensaladas se les realizaron análisis de cuenta en placa para mesófilos aerobios, coliformes totales, hongos y levaduras como pruebas establecidas en las normas NOM-111-SSA1-1994 BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS, NOM-113-SSA1-1994 BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA, NOM-092-SSA1-1994 BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA, y la interpretación de estos resultados se realizó de acuerdo a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-093-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PRACTICAS DE HIGIENE Y SANIDAD EN LA PREPARACION DE ALIMENTOS QUE SE OFRECEN EN ESTABLECIMIENTOS FIJOS, también se llevó a cabo la búsqueda de microorganismos pertenecientes a los género *Salmonella* y *Shigella*, además de *Staphylococcus aureus*, *Serratia plymuthica* y *Serratia rubidaea*. Tabla 4.

5. METODOLOGIA

Ensaladas estudiadas: Se analizaron un total de 25 ensaladas provenientes de 5 comedores de Ciudad Universitaria de las cuales 5 ensaladas fueron obtenidas de uno de los puestos de preparación de comida rápida de la Facultad de Química, 5 del comedor la Facultad de Arquitectura, 5 del comedor la Facultad de Diseño, 5 del comedor la Facultad de Ingeniería y 5 del comedor la Facultad de Odontología. En el cuadro 1 se muestra la fecha de compra y las hortalizas utilizadas para la elaboración de la ensalada

Cuadro 1. Fecha de compra y tipo de ensaladas utilizadas

Ensalada	Fecha de compra	Hortalizas utilizadas en la ensalada
Química1	20 febrero 07	Jitomate, lechuga, pepino, col
Química2	20 febrero 07	Lechuga, nopales, berros, zanahoria
Química3	20 febrero 07	Lechuga, berros, pepino, jitomate
Química4	18 abril 07	Lechuga, jitomate, pepino, nopales
Química5	18 abril 07	Zanahoria, berros, jitomate, nopales
Arquitectura1	11 abril 07	lechuga, nopales, jitomate, brócoli
Arquitectura2	11 abril 07	Lechuga, pepinos, zanahoria, col
Arquitectura3	11 abril 07	Lechuga, jitomate, zanahoria, brócoli
Arquitectura4	18 abril 07	Lechuga, pepino, jitomate, col
Arquitectura5	18 abril 07	Lechuga, nopales, jitomate, zanahoria
Odontología1	11 abril 07	Lechuga, pepinos, zanahoria, col, nopales
Odontología2	11 abril 07	lechuga, nopales, jitomate, brócoli, col
Odontología3	11 abril 07	Lechuga, jitomate, zanahoria, brócoli, nopales
Odontología4	18 abril 07	Lechuga, nopales, jitomate, zanahoria, brocoli
Odontología5	18 abril 07	Lechuga, pepino, jitomate, col, zanahoria
Ingeniería 1	11 abril 07	Lechuga, pepino, jitomate, nopales
Ingeniería 2	11 abril 07	Lechuga, pepino, aguacate, brócoli
Ingeniería 3	11 abril 07	Lechuga, jitomate, col, zanahoria
Ingeniería 4	25 abril 07	Lechuga, brócoli, col, pepino
Ingeniería 5	25 abril 07	Pepino, lechuga, jitomate, nopales
Diseño1	20 febrero 07	Lechuga, jitomate, brócoli, nopales
Diseño2	20 febrero 07	Lechuga, col, zanahoria, pepino
Diseño3	25 abril 07	Lechuga, zanahoria, pepino, nopales
Diseño4	25 abril 07	Col, zanahoria, jitomate, lechuga
Diseño5	25 abril 07	Zanahoria, lechuga, nopales, col, brócoli

5.1 Procesamiento de las ensaladas.

En condiciones asépticas, se colocaron 10g de la ensalada en la bolsa para Stomacher y 90 mL de agua peptonada (dilución 10^{-1}), se sometió a homogeneización en el Stomacher por 120 seg, una vez homogeneizada la muestra en condiciones asépticas se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se tomó una alícuota de 1 mL del homogeneizado y se diluyó en 9 mL de agua peptonada al 0.1% (dilución 10^{-2}), se agitó suavemente hasta tener una mezcla homogénea, se realizaron tres diluciones más de 1:10 para llegar hasta 10^{-5} .

5.1.1 Determinación de microorganismos coliformes totales

De cada una de las muestras, se tomó 1 ml de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} y se colocaron en cajas Petri estériles donde se vertió el Agar Bilis Rojo Violeta Lactosa (ABRV) mantenido a 45° C, se mezcló suavemente con el inóculo con 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en el sentido contrario y 6 de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y se dejó solidificar. Después se vertieron de 4-5 ml de ABRV a 45° C sobre la superficie del medio inoculado. Se dejó solidificar y se incubaron las cajas a 37° C durante 24 horas, al término de este tiempo se realizó la cuenta de UFC.²⁴

5.1.2 Determinación de microorganismos mesófilos aerobios.

De cada una de las muestras, se tomó 1 ml de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} y se colocaron en cajas Petri estériles, se vertió el Agar Cuenta Estándar fundido a 45° C en las cajas y se mezcló suavemente con el inóculo con 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en el sentido contrario y 6 de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y se dejó solidificar y se incubaron las cajas a 35° C durante 24 horas, al término de este tiempo se realizó en cada una de ellas la cuenta de UFC.²⁴

5.1.3 Determinación de hongos y levaduras.

De cada una de las muestras, se tomaron 0.1mL de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} y se colocaron en las cajas de Petri con agar Extracto de Malta, el inóculo se distribuyó homogéneamente con una varilla de vidrio estéril en forma de "L" y se incubaron a 28°C , con revisiones a los 3, 4 y 5 días, al término de este tiempo se realizó en cada caja la cuenta de UFC.²⁴

5.1.4 Aislamiento de *Staphylococcus aureus*.

De cada muestra, se tomaron 0.1mL de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} y se colocaron en las cajas de Petri que contenía Agar Baird Parker, el inóculo se distribuyó homogéneamente sobre el agar con una varilla de vidrio estéril en forma de "L" y se incubaron a 35°C durante 24 horas, al término de este tiempo se realizó la cuenta de UFC de colonias color negro, circulares, convexas, brillantes con una zona circular opaca y un halo claro alrededor de ésta, que son propias de *S. aureus*.

Para la confirmación de *S. aureus* se realiza la prueba de la enzima coagulasa en donde a las cepas aisladas características de *S. aureus* son sembradas en caldo BHI. A 0.2 ml de la suspensión del microorganismo que desarrollo en caldo BHI, se le adicionan 0.2 ml de plasma de conejo, que ha sido previamente diluido volumen a volumen con solución salina estéril.

Se incuba a baño maría o en incubadora, entre 35 a 37°C y observar durante 6 horas en intervalos de 1 h; en caso de no presentarse la formación del coágulo prolongar el periodo de observación hasta 24 h.

Prueba de la enzima termonucleasa

Calentar 15 min en baño de agua hirviendo 0.3 ml de la suspensión del microorganismo que creció en caldo BHI, sembrando por estria el cultivo mencionado anteriormente en agar DNA incubando de 35 a 37°C por 24 h., después del periodo de incubación adicionar colorante azul de orto-toluidina a las estrias en el agar DNA para observar la formación de un color rosa brillante en caso de que el microorganismo posea la enzima termonucleasa

5.1.5 Aislamiento de *Serratia* sp.

De cada una de las muestras, se tomaron 0.1mL de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} y se colocaron en las cajas de Petri que contienen agar DNAsa y MacConkey el inóculo se distribuyó homogéneamente sobre el agar con una varilla de vidrio estéril en forma de "L" y se incubaron a 35° C durante 24 horas, al término de este tiempo se realizó la cuenta de UFC de colonias color grisáceas con un halo amarillo a su rededor y al microscopio se hayan observado bacilos cortos Gram negativos características de *Serratias* sp. En MacConkey se separaron UFC lactosa positiva (Lac. +) y lactosa negativa (Lac. -), debido a que el género *Serratia* puede o no ser fermentador de la lactosa.

5.1.6 Determinación de *Salmonella* y *Shigella*

En condiciones asépticas, se colocaron 25g de la ensalada en la bolsa para Stomacher y 225mL de caldo lactosado, se homogeneizó en el Stomacher por 120 segundos, se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500mL y se incubó a 35° C por 24 horas. Se realizó un enriquecimiento transfiriendo 1mL en caldo Selenito cistina y caldo Tetrionato, se incubó por 24 horas a 43° C, transcurrido el tiempo se tomó un inóculo con el asa microbiológica estéril y se distribuyó por estría cruzada (agotamiento) en Agar Salmonella-Shigella y se incubó a 35° C durante 24 horas. Al termino de éste se separaron las colonias translúcidas planas con un pigmento negro al centro, pequeñas, lactosa negativas que al microscopio fuesen bacilos cortos Gram.negativos presuntivas de *Salmonella* sp y *Shigella* sp.²⁴ Las cepas aisladas se conservaron por repique en Agar Cerebro Corazón y por congelación en Caldo BHI con Glicerol al 10%, hasta su uso.

5.2 Caracterización de cepas (Método convencional o estándar de oro de pruebas bioquímicas y Micrométodo).

5.2.1 Identificación bacteriana por estándar de oro

Preparación de pruebas bioquímicas: Se prepararon los sustratos de las pruebas bioquímicas en tubos de 13 X 100 de acuerdo con las instrucciones de las marcas comerciales y Manual de pruebas bioquímicas de Mac Faddin. ²¹

Activación de cepas e inoculación de sustratos: Las 51 cepas aisladas de las ensaladas se activaron en agar soya tripticasa para revisar pureza y viabilidad se incubaron a 35° C por 24 horas y se sembraron en agar McConkey y se incubaron a 35° C por 24 horas. De cada una de las cepas se tomó una colonia y se realizaron suspensiones bacterianas en tubos con solución salina 0.85% hasta obtener una concentración del 1 MacFarland, y se inocularon cada uno de los tubos con los sustratos preparados de acuerdo al cuadro 2.

Cuadro 2. Pruebas bioquímicas utilizadas para el método convencional

Prueba	Prueba
Reducción de Nitratos	LIA (lisina)
Rojo de Metilo	Voges Proskauer
Utilización de Citrato	Producción de Indol
Descarboxilación de Arginina	Descarboxilación de Ornitina
Kligler (Lac, Gluc, H ₂ S, gas)	Desaminación de Fenilalanina
Hidrólisis de la Urea	Producción de H ₂ S

A los tubos que contenían los sustratos de aminoácido Arginina, Lisina y Ornitina se adicionó cinco gotas de aceite mineral, se incubaron todos los tubos a 35° C por 18 a 24 horas. La lectura e interpretación de resultados se hizo de acuerdo al manual de pruebas bioquímicas Mac Faddin y del Manual de Microbiología Clínica.^{21,54}

5.2.2 Identificación bacteriana por Micrométodo

Preparación de sustratos del método miniaturizado (Micrométodo): Se prepararon los sustratos de las pruebas bioquímicas a doble concentración de acuerdo al manual de pruebas bioquímicas

Mac Faddin²¹ (Anexo 1), donde se observan algunas modificaciones en cuanto a la concentración y ajuste de pH. Se emplearon únicamente los medios líquidos para las pruebas que se observan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Pruebas bioquímicas utilizadas para el micrométodo

Prueba	Prueba
Reducción de nitratos	Fermentación de Arabinosa
Voges-Proskauer	Fermentación de Dulcitol
Producción de indol	Fermentación de Inositol
Producción de ácido sulfhídrico	Fermentación de Manitol
Hidrólisis de la ureasa	Fermentación de Melibiosa
Utilización de citrato	Fermentación de Maltosa
β-galactosidasa	Fermentación de Ramnosa
Descarboxilación de lisina	Fermentación de Rafinosa
Descarboxilación de ornitina	Fermentación de Sacarosa
Descarboxilación de Arginina	Fermentación de Salicina
Desaminación de fenilalanina	Fermentación de Sorbitol
Fermentación de Malonato	Fermentación de Trehalosa
Fermentación de Glucosa	Fermentación de Xilosa
Fermentación de Adonitol	Fermentación/Oxidación de Glucosa
Fermentación de Lactosa	

5.2.3 Preparación de placa de microtitulación.

Lavado de placas de microtitulación: Las placas nuevas se usaron sin esterilizar, las reutilizadas primero se dejaron remojando en Extrán al 10% por 24 horas, posteriormente con un hisopo de algodón se lava cada pozo para remover los residuos, se elimina el excedente sacudiendo la placa en posición invertida y se enjuagaron con agua potable, se dejaron remojar en agua destilada por 24 horas para eliminar los restos de Extrán, se dejaron secar invertidas por media hora y se sacudieron con cuidado sobre una toalla absorbente, para eliminar los restos de líquido excedente, se colocó una cubierta de papel Kraft sobre la placa para cubrir los pozos. Las placas se esterilizaron en el

horno de microondas mediante cuatro ciclos a potencia máxima del horno de microondas, cada ciclo fue de 1 minuto.

En condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar vertical VECO se agregaron 100 L de los sustratos por pozo cada uno, en una placa de microtitulación NUNG de 96 pozos de fondo plano con una micropipeta de 40 a 200 L Ependorf, se colocaron las placas a -72° C en un ultra congelador REVCO por 24 horas, se liofilizaron en una liofilizadora LABCONCO por 4 horas a -44° C y 22 pulgadas de Hg. de presión, se colocaron en bolsas de plástico y se guardaron en un lugar seco y fresco.


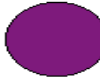



















Control de calidad de los sustratos: Para comprobar la actividad enzimática de los sustratos preparados para el micrométodo se utilizaron cepas puras obtenidas del CEPARIO de la Facultad de Química donadas por la QFB María Antonieta Silva Chávez. Éstas fueron utilizadas como controles positivos (degradación del sustrato) y negativos (sustratos no degradados) para cada sustrato determinado. Las cepas empleadas fueron: *Proteus vulgaris*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *B. megaterium*, *P. aeruginosa* y *Escherichia coli*, de acuerdo con lo que se muestra en el Cuadro 4.






















Cuadro 4. Cepas utilizadas como controles para los sustratos en el micrométodo.






















Sustrato	control +	control -	Sustrato	control +	control -
Lisina	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. vulgaris</i>	Lactosa	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>
Arginina	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	Inositol	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>
Ornitina	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. vulgaris</i>	Manitol	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. vulgaris</i>
Nitratos	<i>E. coli</i>	<i>B. megaterium</i>	Adonitol	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. vulgaris</i>
Sulfhidrico	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Ramnosa	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. vulgaris</i>
VP	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	Arabinosa	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>
Indol	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	Maltosa	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. vulgaris</i>
ONPG	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	Sacarosa	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. coli</i>
Ureasa	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	Trehalosa	<i>E. aerogenes</i>	<i>B. megaterium</i>
Citrato	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	Xilosa	<i>E. aerogenes</i>	<i>B. megaterium</i>
FDA	<i>P. vulgaris</i>	<i>E. coli</i>	Melibiosa	<i>E. aerogenes</i>	<i>P. vulgaris</i>
Malonato	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>	Salicina	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. vulgaris</i>
Dulcitol	<i>K. pneumoniae</i>	<i>B. megaterium</i>	Sorbitol	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. vulgaris</i>
Glucosa	<i>P. vulgaris</i>	<i>B. megaterium</i>			






















Inoculación de las placas de microtitulación con cepas control.

Cada una de las cepas que fueron usadas como controles de la actividad enzimática se sembraron en agar cerebro corazón para verificar pureza y viabilidad por 18 a 24 horas a 35° C, de cada una de ellas se realizó una suspensión bacteriana al 1 de Mac Farland y en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar vertical VECO se agregaron 100 μ L de la suspensión realizada por pozo cada uno donde se encontraba el sustrato liofilizado en las placas de microtitulación con una micropipeta de 40 a 200 μ L Ependorf, sólo a los pozos con lisina, ornitina y arginina se les agregaron dos gotas de aceite mineral, se incubaron a 35° C por 18 a 24 horas. La interpretación se realizó por medio del manual de pruebas bioquímicas Mac Faddin.²¹

medio	control de medio	positivo	negativo
LIS			
ORN			
ARG			
NO3			
H2S			
VP			
SAL			

medio	control de medio	positivo	negativo
IND			
URE			
CIT			
PHE			
ONPG			
MALO			
SOR			

medio	control de medio	positivo	negativo
ADO			
ARA			
DUL			
GLU			
INO			
LAC			
TRE			

medio	control de medio	positivo	negativo
MAN			
MEL			
RAM			
MAL			
RAF			
SAC			
XIL			




medio	control de medio	positivo	negativo
GLUC OF			

Figura 4. Parámetro indicativo reacción positiva/negativa

Los parámetros indicativos de la reacción positiva y la reacción negativa se muestran en la figura

Preparación de inóculo de cepas problema

Las 51 cepas aisladas de las ensaladas se activaron en agar soya tripticasa para revisar pureza y viabilidad se incubaron a 35° C por 24 horas y se sembraron en agar McConkey y se incubaron a 35° C por 24 horas las cuales se clasificaron en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Clasificación de las cepas aisladas.

No	Cepas	Abrev.	No	Cepas	Abrev.
1	Química 1	Q1	27	Diseño 5 t2	D12
2	Química 1-2	Q2	28	Diseño 5-4 (1)	D13
3	Química 2	Q3	29	Diseño 5-4 (2)	D14
4	Química 3-1	Q4	30	Diseño 5-4 (3)	D15
5	Química 3-3	Q5	31	Odontología 3-1	O1
6	Química 4-5	Q6	32	Odontología 3-6	O2
7	Química 5-5 (1)	Q7	33	Odontología 4-4	O3
8	Química 5-5 (2)	Q8	34	Odontología 4-1	O4
9	Arquitectura 2	A1	35	Odontología 4-2	O5
10	Arquitectura 2-2 (1)	A2	36	Odontología 5-4	O6
11	Arquitectura 3-2	A3	37	Odontología 5-1	O7
12	Arquitectura 3-3	A4	38	Odontología 5-2	O8
13	Arquitectura 4-5	A5	39	Odontología 5-3	O9
14	Arquitectura 5-5 (1)	A6	40	Odontología 5-5 (1)	O10
15	Arquitectura 5-5 (2)	A7	41	Odontología 5-5 (2)	O11
16	Diseño 1-1	D1	42	Ingeniería 1-2	I 1
17	Diseño 1-2	D2	43	Ingeniería 4-1	I 2
18	Diseño 4-4 (1)	D3	44	Ingeniería 4-2	I 3
19	Diseño 4-4 (2)	D4	45	Ingeniería 4-5	I 4
20	Diseño 4-4 (3)	D5	46	Ingeniería 5-1	I 5
21	Diseño 4 t1	D6	47	Ingeniería 5-2	I 6
22	Diseño 4 t2	D7	48	Ingeniería 5-3	I 7
23	Diseño 4-5 (1)	D8	49	Ingeniería 5-4 (1)	I 8
24	Diseño 4-5 (2)	D9	50	Ingeniería 5-4 (2)	I 9
25	Diseño 4-5 (3)	D10	51	Ingeniería 5-4 (3)	I 10
26	Diseño 5 t1	D11			

Inoculación de las placas de microtitulación con cepas problema.

Para cada una de las placas de microtitulación con los sustratos liofilizados se adicionó un volumen de 100 µL de la suspensión bacteriana 1 Mac Farland de las 51 cepas aisladas de las ensaladas con una micropipeta multicanal de 100 µL en cada pozo de una línea vertical de la placa, en los pozos de la otra línea vertical se adicionaron 100 µL de solución salina 0.85% estéril, con la finalidad de

obtener una referencia como control de color de medio y de la esterilidad del mismo, a los pozos que contenían los aminoácidos (arginina, lisina y ornitina) se les adicionaron dos gotas de aceite mineral. Se cubrió la placa y se incubó a 37° C por 24 horas en una cámara de humedad.

Prueba de la oxidasa: Para la prueba de oxidasa se utilizaron cultivos de 24 horas. Cada cepa se tomó con un palillo estéril y se depositó en un papel filtro, se agregaron dos gotas del reactivo de oxidasa (Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%) sobre el papel filtro, un cambio de color azul se considera positivo, incoloro negativo.

Lectura de resultados: La interpretación de resultados se realizó por medio del manual de pruebas bioquímicas Mac Faddin y con el Manual de Microbiología Clínica.^{21,54} Para revelar resultados de los sustratos que lo requirieron, como la prueba de indol, se adicionó reactivo de Erlich, para la prueba de V-P se requirió de hidróxido de potasio al 40% y α -naftol al 5%, finalmente al pozo de fenilalanina se agregó cloruro férrico al 40%. Todos los reactivos para revelar las pruebas bioquímicas se prepararon como se indica en el Anexo 2.

RESULTADOS

Se obtuvieron 25 ensaladas de 5 diferentes facultades del campus universitario de la UNAM, de las cuales se pudo obtener 5 ensaladas de cada una de las facultades (puesto de comida rápida de Química, comedor de Diseño, comedor de Arquitectura, comedor de Ingeniería y comedor de Odontología).

6.1 Mesófilos aerobios

En las 25 ensaladas sometidas al análisis para la determinación de mesófilos aerobios se observó que el promedio en la cuenta de microorganismos pertenecientes a este grupo en las diferentes facultades fue para los puestos de Química de 64×10^5 UFC/g, para Diseño un promedio de 55×10^5 UFC/g, para Ingeniería un promedio 70×10^5 UFC/g, para Arquitectura un promedio de 23×10^5 UFC/g y para Odontología un promedio de 22×10^5 UFC/g de cada una de las muestras. Tabla 1

6.2 Cuenta de Coliformes Totales

En las 25 ensaladas sometidas al análisis para la determinación de coliformes fecales se observó que el promedio por gramo de muestra de alimento en la cuenta de microorganismos pertenecientes a este grupo en las diferentes facultades reveló que para Química se obtuvo un promedio de 23×10^5 UFC/g, Diseño un promedio de 32×10^5 UFC/g, Ingeniería un promedio de 12×10^5 UFC/g, Arquitectura un promedio de 25×10^5 UFC/g y Odontología con un promedio de 16×10^5 UFC/g. Tabla 2

Tabla 1. Resultados para mesófilos aerobios de los 5 comedores de diferentes facultades de CU

Ensalada	Cuenta UFC 10 ⁵
Química 1	96 UFC/g
Química 2	107 UFC/g
Química 3	57 UFC/g
Química 4	39 UFC/g
Química 5	20 UFC/g
☐	64 UFC/g
Diseño 1	50 UFC/g
Diseño 2	57 UFC/g
Diseño 3	83 UFC/g
Diseño 4	68 UFC/g
Diseño 5	19 UFC/g
☐	55 UFC/g
Ingeniería 1	30 UFC/g
Ingeniería 2	34 UFC/g
Ingeniería 3	29 UFC/g
Ingeniería 4	10 UFC/g
Ingeniería 5	250 UFC/g
☐	70 UFC/g
Arquitectura 1	31 UFC/g
Arquitectura 2	26 UFC/g
Arquitectura 3	24 UFC/g
Arquitectura 4	17 UFC/g
Arquitectura 5	18 UFC/g
☐	23 UFC/g
Odontología 1	22 UFC/g
Odontología 2	39 UFC/g
Odontología 3	22 UFC/g
Odontología 4	15 UFC/g
Odontología 5	16 UFC/g
☐	22 UFC/g

☐= promedio

Tabla 2. Resultados para Coliformes totales de los 5 comedores de diferentes facultades de CU

Ensalada	Cuenta UFC X 10 ⁵
Química 1	94 UFC/g
Química 2	104 UFC/g
Química 3	328 UFC/g
Química 4	270 UFC/g
Química 5	380 UFC/g
∩	235 UFC/g
Diseño 1	1 UFC/g
Diseño 2	1 UFC/g
Diseño 3	1 UFC/g
Diseño 4	147 UFC/g
Diseño 5	12 UFC/g
∩	32 UFC/g
Ingeniería 1	18 UFC/g
Ingeniería 2	16 UFC/g
Ingeniería 3	26 UFC/g
Ingeniería 4	406 UFC/g
Ingeniería 5	161 UFC/g
∩	125 UFC/g
Arquitectura 1	29 UFC/g
Arquitectura 2	23 UFC/g
Arquitectura 3	34 UFC/g
Arquitectura 4	19 UFC/g
Arquitectura 5	18 UFC/g
∩	25 UFC/g
Odontología 1	4 UFC/g
Odontología 2	13 UFC/g
Odontología 3	5 UFC/g
Odontología 4	2 UFC/g
Odontología 5	57 UFC/g
∩	16 UFC/g

∩= promedio

6.3 Hongos y Levaduras

En las 25 ensaladas sometidas al análisis para la determinación de hongos y levaduras sólo se observó que hubo desarrollo de microorganismos levaduriformes, el promedio por gramo de muestra de alimento obtenido en la cuenta de microorganismos pertenecientes a este grupo para las diferentes facultades fue, para Química un promedio de 158 X 10⁵ UFC/g, para Diseño un promedio

de menos de 1×10^5 UFC/g, para Ingeniería un promedio de 35×10^5 UFC/g, para Arquitectura un promedio de 59×10^5 UFC/g y para Odontología un promedio de 5×10^5 UFC/g de alimento. Tabla

No 3

Tabla 3. Resultados para Hongos y levaduras de los 5 comedores de diferentes facultades de CU

Ensalada	Cuenta UFC 10^5
Química 1	21 UFC/g
Química 2	82 UFC/g
Química 3	1 UFC/g
Química 4	380 UFC/g
Química 5	307 UFC/g
∩	158 UFC/g
Diseño 1	1 UFC/g
Diseño 2	1 UFC/g
Diseño 3	1 UFC/g
Diseño 4	1 UFC/g
Diseño 5	1 UFC/g
∩	1 UFC/g
Ingeniería 1	25 UFC/g
Ingeniería 2	35 UFC/g
Ingeniería 3	17 UFC/g
Ingeniería 4	69 UFC/g
Ingeniería 5	28 UFC/g
∩	35 UFC/g
Arquitectura 1	21 UFC/g
Arquitectura 2	1 UFC/g
Arquitectura 3	1 UFC/g
Arquitectura 4	250 UFC/g
Arquitectura 5	20 UFC/g
∩	59 UFC/g
Odontología 1	21 UFC/g
Odontología 2	1 UFC/g
Odontología 3	1 UFC/g
Odontología 4	1 UFC/g
Odontología 5	1 UFC/g
∩	5 UFC/g

∩= promedio

6.4 *Staphylococcus aureus*

En las 25 ensaladas procesadas para el análisis y búsqueda de *S. aureus*, no se observaron colonias características de éste microorganismo en los medios selectivos utilizados.

6.5 *Salmonella-Shigella y Serratia*

En las 25 ensaladas procesadas para el análisis y búsqueda de los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Serratia*, se logró aislar y separar 51 cepas sospechosas de los géneros en estudio, de las cuales 28 cepas fueron lactosa positiva y 23 cepas lactosa negativa. Tabla 4

Tabla 4. Colonias aisladas Lac (+) y Lac (-)

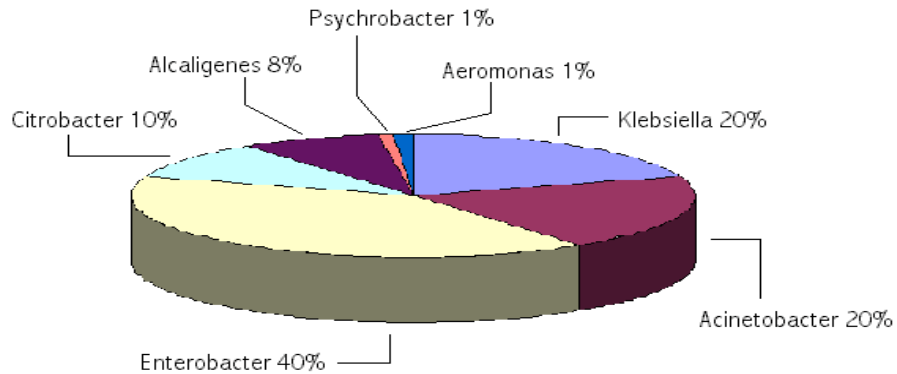
Ensalada	Numero de colonias sospechosas	Lac +	Lac -
Química	8	2	6
Diseño	15	11	4
Ingeniería	10	7	3
Arquitectura	7	3	4
Odontología	11	5	6
total	51	28	23

A todas las cepas lactosa positivas se les realizó pruebas bioquímicas para descartar la presencia de *E. coli*, las cepas que se identificaron como este microorganismo se descartaron, las restantes se procesaron para su identificación por bioquímicas con el sistema convencional de bioquímicas en tubo y por el sistema de identificación miniaturizada (micrométodo) estandarizado en la Facultad de Química.

Para ambos métodos se utilizaron las 51 cepas aisladas en los resultados obtenidos se observó que por el método convencional y micrométodo 20 cepas pertenecen al género *Enterobacter*, 10 al género *Klebsiella*, 10 al género *Acinetobacter*, 5 al género *Citrobacter*, 4 al género *Alcaligenes*, 1 al género *Aeromonas* y 1 al género *Psychrobacter* tabla 6.

Las especies del género *Enterobacter* fueron *E. sakazakii*, *E. cloacae*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae* y *E. aerogenes* con un porcentaje de aparición en las ensaladas de 40%, las del género *Klebsiella* fueron *K. ozaneae*, *K. pneumoniae*, *K. ornithinolytica* y *K. oxytoca* con un porcentaje de aparición en las ensaladas de 20%, las del género *Acinetobacter* fueron *A. calcoaceticus* variedad *anitratos*, *A. calcoaceticus* variedad *lwoffii* y *A. caviae* con un porcentaje de aparición en las ensaladas de 20%, del género *Citrobacter* fueron *C. freundii* con un porcentaje de aparición en las ensaladas de 10%, del género *Alcaligenes* fueron *A. fecalis* con un porcentaje de aparición en las ensaladas de 8% y los géneros *Aeromonas* fueron *A. hydrophila* y *Psychrobacter* fueron *P. phenilpyruvicus* con un porcentaje de aparición en las ensaladas de 1%. Figura 5.

Figura 5. Porcentajes de aislamiento de los géneros identificados en las 25 ensaladas



6.6 Cuadro 6. Comparación de las pruebas bioquímicas obtenidas por los métodos.

Cepas	Q1		Q2		Q3		Q4		Q5		Q6		Q7		Q8		A1		A2		A3		A4		A5		
	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	
BQ's																											
LIS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ND3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UREA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PHE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ROJO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OXID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLUC OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLUC FER	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
MAL	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
DUL	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
INOC	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
M4N	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
ADON	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
RAM	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
ARAB	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
MALT	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
SAC	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
TREH	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
XIL	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
MEL	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
BAL	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
SOF	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
*42 °C	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	NR
*GAS	+	NR	-	NR	+	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	NR
*MOY	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	NR

NR: prueba No Relizada, EO: Estándar de oro, MM: Micrométodo

Continúa Cuadro 6. Comparación de las pruebas bioquímicas obtenidas por los métodos.

Cepas	A6		A7		D1		D2		D3		D4		D5		D6		D7		D8		D9		D10		D11		
	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	
BQ's																											
LIS	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ORN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARG	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H2S	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UREA	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PHE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ROJO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OXID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLUC OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLUC FER	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
MAL	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
DUL	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
INOC	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
MAN	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
ADON	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
RAM	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
ARAB	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
MALT	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
SAC	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
TREH	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
XIL	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
MEL	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
SAL	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
SOR	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
*42 °C	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
*GAS	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
*MOV	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-

NR: prueba No Realizada, EO: Estándar de oro, MM: Micrométodo

Continúa Cuadro 6. Comparación de las pruebas bioquímicas obtenidas por los métodos.

Cepas	D12		D13		D14		D15		O1		O2		O3		O4		O5		O6		O7		O8		O9			
	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM
BQ's																												
LIS	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ORN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARG	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UREA	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PHE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ROJO	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OXID	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLUC OX	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLUC FER	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
MAL	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+
DUL	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
INOC	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
MAN	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
ADON	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
RAM	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
ARAB	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+
MALT	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
SAC	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
TREH	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+
XIL	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
MEL	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
SAL	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
SOR	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
*42 °C	-	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR
*GAS	-	NR	+	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
*MOV	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR

NR: prueba No Relizada, EO: Estándar de oro, MM: Micrométodo

Continúa Cuadro 6. Comparación de las pruebas bioquímicas obtenidas por los métodos.

Cepas	O10		O11		I11		I12		I13		I14		I15		I16		I17		I18		I19		I110	
	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM	EO	MM
BQ's	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
LIS	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
ORN	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
ARG	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
NO3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UREA	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
CIT	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
PHE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
LAC	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
ROJO	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
OXID	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLUC OX	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
GLUC FER	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
ONPG	NR	-	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
MAL	NR	-	NR	-	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
DUL	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
INOC	NR	-	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+
MAN	NR	+	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
ADON	NR	-	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
RAM	NR	-	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
ARAB	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
MALT	NR	-	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
SAC	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
TREH	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
XIL	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
MEL	NR	-	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
SAL	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
SOR	NR	-	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-
*42 °C	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
*GAS	-	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR	-	NR
*MOV	-	NR	-	NR	-	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR	+	NR

NR: prueba No Relizada, EO: Estándar de oro, MM: Micrométodo

Tabla 5. Identificación bacteriana de las cepas aisladas

No	muestra	Resultados por ambos métodos
1	Q1	<i>Klebsiella ozaenae</i>
2	Q2	<i>Acinetobacter calcoaceticus var. lowffi</i>
3	Q3	<i>Klebsiella ozaenae</i>
4	Q4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5	Q5	<i>Klebsiella ozaenae</i>
6	Q6	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
7	Q7	<i>Enterobacter gergoviae</i>
8	Q8	<i>Acinetobacter calcoaceticus var. lowffi</i>
9	A1	<i>Klebsiella ozaenae</i>
10	A2	<i>Acinetobacter calcoaceticus var. lowffi</i>
11	A3	<i>Acinetobacter calcoaceticus var. anitratos</i>
12	A4	<i>Enterobacter aerogenes</i>
13	A5	<i>Acinetobacter calcoaceticus var. anitratos</i>
14	A6	<i>Enterobacter agglomerans</i>
15	A7	<i>Klebsiella ozaenae</i>
16	D1	<i>Citrobacter freundii</i>
17	D2	<i>Acinetobacter calcoaceticus var. lowffi</i>
18	D3	<i>Enterobacter agglomerans</i>
19	D4	<i>Enterobacter cloacae</i>
20	D5	<i>Enterobacter cloacae</i>
21	D6	<i>Citrobacter freundii</i>
22	D7	Complejo <i>Aeromonas hydrophila</i>
23	D8	<i>Enterobacter cloacae</i> subespecie <i>cloacae</i>
24	D9	<i>Klebsiella ozanae</i>
25	D10	<i>Enterobacter cloacae</i>
26	D11	<i>Citrobacter freundii</i>
27	D12	<i>Klebsiella oxytoca</i>
28	D13	<i>Enterobacter sakazaki</i>
29	D14	<i>Acinetobacter caviae</i>
30	D15	<i>Enterobacter sakazaki</i>
31	O1	<i>Acinetobacter calcoaceticus var. lowffi</i>
32	O2	<i>Enterobacter gergoviae</i>
33	O3	<i>Psychrobacter phenilpyruvicus</i>
34	O4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
35	O5	<i>Alcaligenes faecalis</i>
36	O6	<i>Enterobacter cloacae</i>
37	O7	<i>Enterobacter cloacae</i>

Continúa Tabla 5. Identificación de las cepas aisladas

No	muestra	Resultados por ambos métodos
38	O8	<i>Enterobacter cloacae</i>
39	O9	<i>Citrobacter freundii</i>
40	O10	<i>Alcaligenes faecalis</i>
41	O11	<i>Alcaligenes faecalis</i>
42	I 1	<i>Acinetobacter calcoaceticus var. lowffii</i>
43	I 2	<i>Enterobacter cloacae</i>
44	I 3	<i>Enterobacter cloacae</i>
45	I 4	<i>Alcaligenes faecalis</i>
46	I 5	<i>Enterobacter cloacae</i>
47	I 6	<i>Enterobacter cloacae</i>
48	I 7	<i>Enterobacter agglomerans</i>
49	I 8	<i>Alcinetobacter calcoaceticus var. lowffii</i>
50	I 9	<i>Enterobacter cloacae</i>
51	I 10	<i>Citrobacter freundii</i>

Tabla 6. Número de cepas de acuerdo al género aislado

Género	No de cepas
Enterobacter	20
Klebsiella	10
Acinetobacter	10
Citrobacter	5
Alcaligenes	4
Aeromonas	1
Psychrobacter	1

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Comparativo general

La interpretación de resultados se hizo en base a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-093-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PRACTICAS DE HIGIENE Y SANIDAD EN LA PREPARACION DE ALIMENTOS QUE SE OFRECEN EN ESTABLECIMIENTOS FIJOS, la cual señala que el límite permitido en ensaladas frescas crudas para microorganismos levaduriformes es de 10 UFC/g, para Mesófilos aerobios es de 15×10^4 UFC/g y para Coliformes totales es < 100 UFC/g. En la cual podemos constatar que todas nuestras muestras sobrepasan estos límites ya que tenemos cuentas de UFC del orden de 10^5 , lo que hace ver que la contaminación por estos tipos de microorganismos en las muestras obtenidas en los diferentes sitios de elaboración de alimentos del campus universitario es muy elevada, lo que puede deberse a la falta de higiene, a la manipulación al momento de prepararlos y servirlos, por la exposición al medio ambiente, por la contaminación de la materia prima por un mal lavado o desinfectado y finalmente podemos decir que las muestras de ensaladas que se obtuvieron son de mala calidad sanitaria por toda la contaminación microbiana presente. Tabla 7.^{48, 49, 52, 12, 28}

Tabla 7 Cuenta microbiana en las 25 ensaladas expendidas en los diferentes puestos de comida del Campus Universitario.

	Hongos y Levaduras	Coliformes totales	Mesofilos aerobios	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella sp</i> <i>Shigella sp</i> <i>Serratia sp.</i>
Química	158×10^5	235×10^5	64×10^5	(-)	(-)
Diseño	$< 1 \times 10^5$	32×10^5	55×10^5	(-)	(-)
Arquitectura	59×10^5	25×10^5	23×10^5	(-)	(-)
Ingeniería	35×10^5	125×10^5	70×10^5	(-)	(-)
Odontología	5×10^5	16×10^5	22×10^5	(-)	(-)

Una de las determinaciones muy importantes en los alimentos es la presencia de *S. aureus*, que es una microorganismo que se encuentra en la piel y vías respiratorias altas de las personas portadoras

sanas, además que son agentes causales de una gran variedad de enfermedades, que van desde infecciones menores en piel como forúnculos, ampollas y abscesos cutáneos hasta enfermedades que pueden poner en peligro la vida humana como la neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock tóxico (SST) y sepsis. Si bien es cierto que en la NOM-093-SSA1-1994 no se establecen cuentas límites para la determinación de *S. aureus* en ensaladas si creemos conveniente su determinación debido a que el 50% de la población es portadora de este microorganismo y si en la preparación o manipuleo el personal no tiene el cuidado o la higiene necesaria podría contaminar el alimento con *S. aureus*. La NOM-115-SSA1-1994 BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN ALIMENTOS, establece el rango adecuado para el análisis de alimentos en los cuales se esperen más de 100 células de *Staphylococcus aureus* por gramo de muestra.

En nuestro estudio no se observó desarrollo de este microorganismo por lo que no fue necesario hacer cálculos de cepas patógenas por gramo de muestra, por lo tanto todas las muestras analizadas están libres de *S. aureus* y cumplen con las especificaciones permitidas por la norma anteriormente mencionada Tabla 7.^{50, 51}

El aislamiento e identificación de bacilos Gram negativos especialmente los pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* cumplen un papel muy importante sobre todo de aquellos miembros causantes de problemas digestivos, como es el caso de *Salmonella* sp y de *Shigella* sp que pueden ser transferidos a un humano por medio de los alimentos, por lo que la reglamentación gubernamental estableció la norma NOM-114-SSA1-1994 BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA-SHIGELLA EN ALIMENTOS la que indica que dichos patógenos no deben estar presentes en 25g de alimento, en lo que se refiere a nuestro estudio ninguna de las 51 cepas aisladas de las 25 ensaladas se determinó como *Salmonella* sp o *Shigella* sp, por lo que las 25 ensaladas cumplen con esta norma.⁵³

En lo que se refiere al género *Serratia* hay algunos reportes que las asocian con infecciones gastrointestinales en personas inmunodeprimidas producto del consumo de ensaladas frescas, esto es debido a que en un estudio a la comida y la flora bacteriana de las manos del personal encargado de las cocinas de un Hospital de Costa Rica se encontró que el 100% de las muestras para ensaladas crudas tenían algún tipo de contaminación, mientras que en los aislados de la flora bacteriana el 1,74% correspondía al género *Serratia*, esto hace pensar que la contaminación del alimento proviene de la falta de higiene al momento de la manipulación de éste⁷⁷, además el uso de aguas tratadas como riego aumenta la probabilidad de contaminación de los vegetales comestibles con este género de ahí la necesidad de buscar *Serratia* en alimentos frescos^{74, 75, 76}. En nuestro estudio con las 25 ensaladas analizadas no se aisló ni se identificó al género *Serratia*.

También es importante mencionar que a pesar de que se cumplen las normas en algunas de estas muestras, existe una contaminación muy elevada de microorganismos para las pruebas realizadas, esto es debido quizá a la manipulación y transporte del alimento, falta de higiene al prepararlo; debido a eso podemos concluir que la calidad sanitaria de las muestras es mala.

7.2 Identificación bacteriana por ambos métodos

El micrométodo es un sistema de identificación bacteriana específicamente de bacilos Gram negativos implementado y estandarizado en el Cepario de la Facultad de Química (Rojo y cols 2002) este sistema sólo fue probado con cepas tipo y lo que se pretendió en este estudio es compararlo con un estándar de identificación microbiana, como lo es el sistema convencional de identificación bacteriana de bioquímica en tubo (estándar de oro).⁵⁴

Las identificaciones obtenidas por el micrométodo de las 51 cepas fueron comparadas con las obtenidas por método convencional, dando como resultado una similitud al 100% en la identidad de los microorganismos por ambos métodos.

Es muy importante mencionar que la diferencia en los resultados para los sustratos utilizados en ambos métodos es mínima y puede realizarse una lectura de resultados para ambas técnicas confiable por lo que se puede obtener información similar acerca el tipo de microorganismo con el que se trabaja a fin de identificar microorganismos llegando a la misma conclusión en ambos métodos.⁵⁴ Cuadro 7.

Cuadro 7. Diferencias entre ambos los métodos Estándar de oro y Micrométodo

No	muestra	Diferencias por ambos métodos
1	A3	Gluc fer /oxid / gluc / cit
2	A4	arg / lac/ rojo de metilo
3	A6	Indol
4	Q3	lac / arg
5	Q4	lis / cit / lac
6	Q7	Indol
7	D1	urea / indol
8	D2	gluc / urea / H ₂ S
9	D7	cit / VP
10	D8	Ornitina
11	D10	Ornitina
12	D12	Lis
13	D14	Gluc
14	O2	cit / urea/ H ₂ S / lis / arg
15	O10	Cit
16	I1	cit / Phe
17	I2	Urea
18	I3	VP
19	I4	Urea
20	16	arg / urea
21	I7	ornitina / arg

Dentro de la familia de las *Enterobacteriaceae* encontramos al género *Enterobacter*, este género está presente con un 40% de existencia en nuestras cepas identificadas, esto es debido a que se encuentran libremente en el suelo, vegetales frescos y crudos y en el agua utilizada para cultivos, este tipo de género es causante de las infecciones oportunistas. Partiendo del intestino del paciente, también pueden colonizar otras regiones corporales y causar infecciones graves. Las infecciones más frecuentes son las renales y de las vías urinarias, respiratorias, cutáneas y de partes blandas,

así como sepsis y meningitis. Algunos ejemplos de los factores de riesgo son la litiasis y la inmunodepresión.^{55,57}

Por otro lado desde el punto de vista de la medicina humana, los representantes más importantes del género *Enterobacter* son *E. cloacae* y *E. aerogenes*, en nuestro estudio encontramos las especies *E. agglomerans*, *E. gergoviae* y *E. sakazakii*⁵⁵

E. sakazakii es un microorganismo con una elevada capacidad de formar biofilms en superficies. *Enterobacter sakazakii*, no es un fecal, por lo tanto no crece bien a temperaturas superiores a 40 ° C. Sin embargo, a 10° C manifiesta una elevada actividad celular, de forma que tras 5 horas a esta temperatura pueden evidenciarse elevados niveles de contaminación. A temperatura ambiente (entre 20 y 25 ° C) es capaz de duplicarse cada 40 minutos, lo que da una idea de su capacidad de multiplicación.⁵⁶

Estos datos indican que el vehículo de transmisión es más de tipo ambiental que fecal. Así, se ha demostrado que se trata de un microorganismo con una elevada capacidad para formar biopelículas en superficies. En estos casos, el aire es uno de los vehículos de diseminación más importantes. El problema aquí es la localización de los focos de contaminación. Una pauta de actuación es la búsqueda de las superficies húmedas o semi-húmedas, puesto que el microorganismo difícilmente crecerá en ausencia de agua.⁵⁵

Enterobacter gergoviae es un patógeno muy raro en los humanos⁵⁸. Las infecciones por ésta especie se han asociado frecuentemente a la existencia de factores de riesgo, como son la inmunosupresión, la utilización previa de antimicrobianos. También se ha relacionado con estancias prolongadas en el hospital, especialmente en las unidades de vigilancia intensiva⁵⁹.

Los niños pequeños son especialmente susceptibles de presentar infecciones por estas especies de *Enterobacter*, pudiendo presentar meningitis neonatal.

Enterobacter agglomerans causa fundamentalmente infecciones nosocomiales, aunque también se han descrito casos de meningitis neonatal y de artritis séptica. Puede crecer en medios ricos en glucosa, por lo que ocasionalmente produce infecciones relacionadas con la infusión intravenosa de sueros, que pueden originar brotes de bacteriemia en los hospitales ⁶⁰. Se ha referido un aumento de las resistencias de este microorganismo a los antibióticos betalactámicos, lo que puede motivar el empleo de los carbapenemes en ciertos casos ^{61,62}.

Otro de los géneros encontrados dentro de la familia *Enterobacteriaceae* es el género *Klebsiella* que está representado por el 20% de las cepas identificadas en nuestro estudio, este tipo de género se encuentra presente debido a que este tipo de microorganismos pueden ser recolectados de ambientes naturales tales como tierra, el agua fresca, vegetales donde residen normalmente como microflora y también pueden ser recolectados de las heces de los individuos, en alrededor del 30% de la población sana se encuentran en el tracto gastrointestinal o en las vías respiratorias superiores. Las enfermedades provocadas por *Klebsiella* son principalmente neumonía (neumonía de Friedländer), sepsis e infección urinaria. No obstante, en ocasiones también pueden provocar endocarditis, meningitis, enteritis o infecciones de partes blandas. ⁶³

Los representantes más importantes son *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*. Otra especie con importancia en medicina humana es *Klebsiella ozaenae* y forma parte de los patógenos habituales en las infecciones nasofaríngeas. ^{64,66}

Klebsiella pneumoniae es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, desempeña un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas, dentro de este género bacteriano, está implicada principalmente en infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos e infecciones de herida quirúrgica. ⁶⁵

Citrobacter es otro de los géneros presentes dentro de la familia de las *Enterobacteriaceae*, la cual está representada por el 10% de las cepas identificadas en nuestro estudio, al igual que *Enterobacter* y *Klebsiella* este tipo de microorganismos se encuentran en alimentos, suelos, agua, verduras y el tracto intestinal, residen en estos como microflora, de tal manera son causantes de enfermedades gastrointestinales infecciones importantes, especialmente en huéspedes inmunodepresivos, por lo que es común al igual que los dos géneros anteriores ser encontrado en nuestro estudio, en este caso sólo se encontró *Citrobacter freundii*.

La familia de *Moraxellaceae* está representada en nuestro grupo de estudio por el 21% de las cepas identificadas de las cuales son pertenecientes al género *Acinetobacter* y *Psychrobacter*. Dichos géneros se encuentran presentes debido a que en el caso de *Acinetobacter* es frecuentemente aislado en infecciones nosocomiales especialmente en las unidades de cuidados intensivos, donde tanto los casos esporádicos como los epidémicos y endémicos son comunes^{67, 68}. *A. baumannii* es una causa frecuente de neumonía nosocomial, sobre todo asociada con la ventilación mecánica. Puede causar otras infecciones incluídas infecciones de la piel y de la heridas, bacteriemia y meningitis, pero *A. Iwoffi* es el principalmente responsable de este última.⁶⁹

En el caso de *Psychrobacter* su hábitat es el ambiente en general, pero es más abundante en la región nasofaríngea de algunos animales, como los bovinos, usualmente reside en las vías respiratorias, pero puede acceder al aparato respiratorio en pacientes con trastornos pulmonares crónicos o inmunodeficientes, ocasionando traqueobronquitis neumonía.⁷⁰

La familia *Alcaligenaceae* está representada en nuestro grupo de estudio por el 8% de las cepas identificadas de las cuales son pertenecientes al género *Alcaligenes* que se encuentran en el suelo con ambiente húmedo y el agua. En el caso de *A. faecalis* forma parte de la flora saprófita de la piel y el tracto gastrointestinal, normalmente es considerada como un patógeno oportunista en pacientes

con factores predisponentes para desarrollar infecciones (inmunosupresión, diabetes, alcoholemia)

71, 72, 73

CONCLUSIONES

- ✓ No se encontró presencia de los patógenos *Serratia* sp, *Salmonella* sp, *Shigella* sp y *Staphylococcus aureus* en las muestras analizadas.
- ✓ La técnica del micrométodo puede ser aplicada para la identificación de microorganismos patógenos en un alimento (en este caso ensaladas).
- ✓ La técnica del micrométodo permite obtener resultados confiables comparados con el método tradicional.
- ✓ Con el micrométodo utilizamos un número mayor de sustratos pero a menor costo que a diferencia del método estándar de oro donde se utilizan menos sustratos, con mayor volumen de reactivos y por lo tanto con mayor costo.
- ✓ La técnica del micrométodo es más sencilla de realizar y ocupa menos espacio que la técnica de estándar de oro.
- ✓ Con el micrométodo se puede obtener más rápidamente información acerca el tipo de microorganismo con el que se trabaja debido a la gran cantidad de sustratos utilizados.
- ✓ La calidad sanitaria de las ensaladas analizadas es mala ya que se presentan cuentas de UFC para hongos y levaduras, mesófilos aerobios y coliformes totales por arriba del lo permitido en las normas respectivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. W. C. Frazier, D. C. Westhoff., Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia, S. A. Cuarta Edición, pp 23-87, 259-288
2. Michael P. Doyle. Microbiología de los alimentos, fundamentos y Fronteras. Editorial Acribia S. A. Zaragoza España p. 122
3. Arias-Echandi María L., Antillón G. Florencia. Contaminación microbiológica de los alimentos en costa rica. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Volumen 11/No. 2/ Abril-Junio, 2000
4. Felhaber K. and G. Krüger. The study of Salmonella enteritidis growth kinetics using Rapid automated bacterial impedance Technique. Journal of Applied Microbiology 1998, Vol. 84, No. 6. June, pág. 945-949.
5. James B. Mycobacterium Tuberculosis in: Use and Interpretation of test in Infecctious diseases. Speciality Laboratories. 4ª. Ed. CA, USA. 1996. p. 208-209
6. Garza Velasco Raúl.: Manual de Practicas Bacteriología, (1994)
7. Jawetz Ernest, L. Melnide Joseph, Adelberg Edward, Microbiología médica, Ed. El Manual Moderno S.A. de C.V., México, D.F., 12ª. Edición 1988 p.185-255
8. Hernández Gómez Luciano. Memorias del curso de Taxonomía Microbiana, llevado a cabo el 28 de febrero al 4 de marzo del año 2000. En la escuela de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez, Estado de Durango.
9. Sonnenwith C. Alex; Jarett Leonanr. Gradwohl. Métodos y Diagnostico de laboratorio Clínico. 8ª. Ed. Editorial Panamericana. 1986 p. 1596

Microbiología General 2001, México DF 2001, Ed. Facultad de Química, pp. 165-195

21. Mac Faddin J.: Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria., Lippincott Williams and Wilkins, Third edition, 2000.
22. Contreras O. R., Roura G. Fernández D. Diagnostico del urocultivo en 4 horas por el sistema Diramic 03. Latinoamericana de Microbiología Abril-Junio 92 Vol. 34, No. 2 pag 83-86
23. Merck E. Cultura Media Handbook. Frankfurter Strasse 250. D-6100 Darmstadt 1 Federal Republic of Germany.
24. Palao Mercedes, Ortega Aurora, Giles Martha. Manual de Prácticas de Microbiología de Alimentos 1998, México DF 1998, Ed. Facultad de Química pp 20-46
25. <http://bilbo.edu.uv/microbio/identificación.htm>
26. http://www.encolombia.com/acovez24_reacción21.htm
27. http://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus
28. <http://fr.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9sophile>
29. <http://es.wikipedia.org/wiki/Mes%C3%B3filo>
30. <http://www.dibico.com>
31. <http://es.wikipedia.org/wiki/Coliforme>
32. Ted F. Wetzler; Paul Musick; Harry Johnson; and Wesley A. MacKenzie. An analysis of methods for cleansing and sanitizing plants that process poultry leads to the description of an acceptable method which employs a steam gun for initial degreasing followed by an iodophor brushing operation. THE CLEANING AND SANITIZING OF POULTRY PROCESSING PLANTS

33. BARBARA J. ROBISON, Evaluation of a Fluorogenic Assay for Detection of *Escherichia coli* in Foods. American Society for Microbiology . Vol. 48, No. 2 APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Aug. 1984, p. 285-288
34. JULIAN M. COX^t. Lysine-Mannitol-Glycerol Agar, a Medium for the Isolation of *Salmonella* spp., Including *S. typhi* and Atypical Strains. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Aug. 1993, p. 2602-2606 Vol. 59, No. 8
35. XIAOQING HE^{**} AND RUONAN PAN² Bacteriophage Lytic Patterns for Identification of *Salmonellae*, *Shigellae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Enterobacter cloacae*. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Mar. 1992, P. 590-594. American Society for Microbiology. Received 16 June 1991/Accepted 12 December 1991. Vol. 30, No. 3
36. C. M. O'HARA,* P. B. SMITH, AND B. A. SCHABLE. Evaluation of the Mini-ID Enterobacteriaceae Screen System. Vol. 26, No. 12 JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Dec. 1988, p. 2604-2607
37. CHARLES E. STAGER,^{1,2} ERIC ERIKSON,¹ AND JAMES R. DAVIS^{2,3*}. Rapid Method for Detection, Identification, and Susceptibility Testing of Enteric Pathogens. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 1983, p. 79-84 Vol. 17, No. 1
38. JOSEPH L. STANECK,^{*} JEAN VINCELETTE,² FRANCOIS LAMOTHE ² AND ELIZABETH A. POLK^{3t}. Evaluation of the Sensititre System for Identification of Enterobacteriaceae. Vol. 17, No. 4 JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 1983, p. 647-654
39. ARTHUR L. BARRY* AND ROBERT E. BADAL. Identification of Enterobacteriaceae by the AutoMicrobic System: Enterobacteriaceae Biochemical

- Cards Versus Enterobacteriaceae-Plus Biochemical Cards. Vol. 15, No. 4
JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 1982, p. 575-581
40. TAKASHI AOKI* AND ATSUSHI TAKAHASHI. Class D Tetracycline Resistance
Determinants of R Plasmids from the Fish Pathogens *Aeromonas hydrophila*,
Edwardsiella tarda, and *Pasteurella piscicida*. ANTIMICROBIAL AGENTS AND
CHEMOTHERAPY, Aug. 1987, p. 1278-1280 Vol. 31, No. 8
41. MARIA C. THALLER,¹* FRANCESCA BERLUTTI,¹ BENEDETTO DAINELLI,²
AND RENATO PEZZI'. New Plate Medium for Screening and Presumptive
Identification of Gram-Negative Urinary Tract Pathogens. Vol. 26, No. 4
JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 1988, p. 791-793
42. KAILI FAN,¹ ARTHUR J. MORRIS,^{12*} AND L. BARTH RELLER"^{1,2'3}. Application
of Rejection Criteria for Stool Cultures for Bacterial Enteric Pathogens. JOURNAL
OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 1993, p. 2233-2235 Vol. 31, No. 8
43. CARL D. BRANDT,^{12†*} HYUN WHA KIM,¹² WILLIAM J. RODRIGUEZ,"² JULITA
O. ARROBIO,' BARBARA C. JEFFRIES,' AND ROBERT H. PARROTT' ².
Simultaneous Infections with Different Enteric and Respiratory Tract Viruses.
JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 1986. p. 177-179 Vol. 23, No. 1
44. STEPHEN C. EDBERG* AND RICHARD W. TREPETA. Rapid and Economical
Identification and Antimicrobial Susceptibility Test Methodology for Urinary Tract
Pathogens. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Dec. 1983, p. 1287-1291
Vol. 18, No. 6
45. M. C. GEORGES,¹ I. K. WACHSMUTH,^{2*} D. M. V. MEUNIER,³ N. NEBOUT,³ F.
DIDIER,³ M. R. SIOPATHIS,³ AND A. J. GEORGES'. Parasitic, Bacterial, and

- Viral Enteric Pathogens Associated with Diarrhea in the Central African Republic.
JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 1984, P. 571-575 Vol. 19, No. 5
46. MICHAEL E. STILES* AND LAI-KING NG. Biochemical Characteristics and Identification of Enterobacteriaceae Isolated from Meats. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Mar. 1981, P. 639-645 Vol. 41, No. 3
47. HIDEO ITO, NOBUO KIDO, YOSHICHIKA ARAKAWA, MICHIO OHTA, TSUYOSHI SUGIYAMA, AND NOBUO KATO*. Possible Mechanisms Underlying the Slow Lactose Fermentation Phenotype in Shigella spp. Vol. 57, No. 10 APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Oct. 1991, p. 2912-2917
48. NOM-111-SSA1-1994 BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS
49. NOM-113-SSA1-1994 BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES EN PLACA.
50. NOM-115-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN ALIMENTOS.
51. NOM-034-SSA1-1993 BIENES Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA CARNE. CARNE MOLIDA Y CARNE MOLIDA MOLDEADA. ENVASADAS
52. NOM-092-SSA1-1994 BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.
53. NOM-114-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACION DE SALMONELLA-SHIGELLA EN ALIMENTOS.
54. Manual of Clinical microbiology. Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Michael A. Pfaller, Robert H. Tenover. 8th Edition, vol.1. pag 636-653
Cap. 41/654-674 Cap. 42

55. Lai KK. Enterobacter sakazakii infections among neonates, infants, children, and adults. *Medicine* 2001; 80:113-22.
56. Food and Agriculture Organization. 1994 Codex Alimentarius: code of hygienic practice for foods for infants and children. CAC/RCP 21-1979. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
57. Sanders WE, Sanders CC. Enterobacter spp: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 220-241.
58. Canton R, Oliver A, Coque TM, Varela M del C, Pérez- Díaz JC, Baquero F. Epidemiology of extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacter isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1237-1243.
59. Pitout JDD, Moland ES, Sanders CC, Thomson KS, Fitzsimmons SR. B-lactamases and detection of B-lactam resistance in Enterobacter spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 35-39.
60. Aguado García JM, Lumbreras Bermejo C. Infecciones por enterobacterias. *Medicine* 1998; 7: 3622-3628.
61. Ewing WH & Fife MA (1972) Ewing, W. H., and Fife, M. A. "Enterobacter agglomerans (Beijerinck) comb. nov. (the Herbicola-Lathyri bacteria)." *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1972) 22:4-11. [No PubMed record available.]
62. Gavini F et al. (1989) Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., and De Ley, J. "Transfer of Enterobacter agglomerans (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to Pantoea gen. nov. as Pantoea agglomerans comb. nov. and description of Pantoea dispersa sp. nov." *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1989) 39:337-345. [No PubMed record available.]

63. Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed., McGraw Hill, p. 370. ISBN 0838585299.
64. Podschun R, Ullmann U (1998). "Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors". *Clin Microbiol Rev* 11 (4): 589-603.
65. Bagley S (1985). "Habitat association of *Klebsiella* species". *Infect Control* 6 (2): 52-8.
66. Dien B, Cotta M, Jeffries T (2003). "Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status". *Appl Microbiol Biotechnol* 63 (3): 258-66. klebsiella oxytoca
67. Gerischer U (editor). (2008). *Acinetobacter Molecular Biology*, 1st ed., Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-20-2 .
68. Dijkshoorn L (2008). "The Diversity of the Genus *Acinetobacter*", *Acinetobacter Molecular Biology (Gerischer U, ed.)*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-20-2 .
69. Rahal J (2006). "Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species.". *Clin Infect Dis* 43 Suppl 2: S95-9. PMID 16894522.
70. Ala'Aldeen, D. A. A. (2007). "Neisseria and moraxella". In Greenwood, David; Slack, Richard; Peitherer, John; & Barer, Mike (Eds.), *Medical Microbiology* (17th ed.), p. 258. Elsevier. ISBN 978-0-443-10209-7.
71. Aisemberg G, Rolston KV, Safdar A. Bacteremia caused by *Achromobacter* and *Alcaligenes* species in 46 patients with cancer (1989-2003). *Cancer* 2004; 101:2134-40.

72. Ashwath ML, Katner HP. Pancreatic abscess secondary to *Alcaligenes faecalis*. *Am J Med Sci* 2005; 329:54-5.
73. McGowan JE, Steinberg JP. Other gram-negative bacilli. In: Mandell, Douglas and Bennett (Eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th Edition. New York. Churchill Livingstone 1995:2106-17.
74. PABLO CARRERO,^{1*} JOSE´ A. GARROTE,² SANTIAGA PACHECO,² ANA I. GARCÍA,² ROSARIO GIL,² AND SANTIAGO G. CARBAJOSA¹. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Feb. 1995, p. 275–276 Vol. 33, No. 2 Report of Six Cases of Human Infection by *Serratia plymuthica* Received 10 May 1994/Returned for modification 23 June 1994/Accepted 3 November 1994
75. DIEGO DOMINGO,* AURORA LIMIA, TERESA ALARCON, JUAN C. SANZ, MARIA C. DEL REY, AND MANUEL LOPEZ-BREA. Nosocomial Septicemia Caused by *Serratia plymuthica*. Department of Microbiology, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain Received 28 July 1993/Returned for modification 24 August 1993/Accepted 5 November 1993
76. PEDRO ROJO URSUA,^{1*} M. JOSEBE UNZAGA,¹ PILAR MELERO,¹ INˆAKI ITURBURU,² CARMEN EZPELETA,¹ AND RAMON CISTERNA¹ *Serratia rubidaea* as an Invasive Pathogen. *Department of Microbiology¹ and Department of Surgery,² Hospital de Basurto, 48013 Bilbao, Bizkaia, Spain*. Received 17 July 1995/Returned for modification 18 August 1995/Accepted 3 October 1995
77. Fabiola Jiménez, Laura Garro, Evelyn Rodríguez, Zenén Zeledón. Evaluación de la presencia de bacterias en alimentos y en el ambiente de una sección de oncología de un hospital nacional, San José, Costa Rica. Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en

Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica,
San José, Costa Rica.

78. NOM NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-093-SSA1-1994, BIENES Y
SERVICIOS. PRACTICAS DE HIGIENE Y SANIDAD EN LA PREPARACION DE
ALIMENTOS QUE SE OFRECEN EN ESTABLECIMIENTOS FIJOS.

ANEXO 1

ELABORACION DE SUSTRATOS BIOQUIMICOS EMPLEADOS EN EL MICROMETODO

Reducción de Nitratos:

Ingredientes:

- Extracto de carne	0.06g
- Peptona	0.10g
- Nitrato de potasio (KNO ₃)	0.02g
- Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05	10.0 mL

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciometro y ajustar el pH de 7.06 ± 0.01.

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras, por 15 minutos, tambien puede esterilizarse por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µm esteril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reactivos para revelar la reacción

- 1) Reactivo A (β-naftilamina 0.5%)
- 2) Reactivo B (ácido sulfanilico 0.8%)

Adicionar unas gotas del reactivo A y una gota del reactivo B al pozo que contiene este medio.

Reacción positiva (+): color rojo en el medio o la superficie (formación de un compuesto diazoico).

Reacción negativa (-): incoloro

Reacción negativa (-): una vez que fue incolora, adicionar polvo de Zinc, la coloración cambia a rojo.

Voges-Proskauer:

Ingredientes:

- Polipeptona	0.14g
- Glucosa	0.10g
- Fosfato Dipotasico (K ₂ HPO ₄)	0.10g
- Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05	10.0 mL

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciometro y ajustar el pH de 6.89 ± 0.01.

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras, por 15 minutos, también puede esterilizarse por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µm esteril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reactivos para revelar la reacción

- 1) β-naftol al 5%
- 2) Hidroxido de potasio (KOH) al 40%

Adicionar unas gotas de KOH y una gota de β-naftol

Reacción positiva (+): color rojo en la superficie del medio o a sus orillas indicando presencia de acetoina

Reacción negativa (-): no cambia de color la superficie del medio

Producción de Indol:

Ingredientes:

- | | |
|----------------------------------|---------|
| - Peptona de Caseína* | 0.4g |
| - Cloruro de Sodio | 0.10g |
| - Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05 | 10.0 mL |

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciómetro y ajustar el pH de 7.02 ± 0.01.

Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras, por 15 minutos, también puede esterilizarse por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µm esteril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reactivos para revelar la reacción

Reactivo de Erlich

Adicionar dos gotas del reactivo al micropozo

Reacción positiva (+): color rojo o un anillo rojo en la superficie del medio

Reacción negativa (-): incoloro o ligeramente amarilla

* La caseína contiene 1.2 g de triptofano por cada 100g

Producción de Ácido Sulfhídrico:

Ingredientes:

- | | |
|------------------------|-------|
| - Extracto de carne | 0.06g |
| - Extracto de Levadura | 0.06g |
| - Peptona de Caseína | 4.00g |

- Lactosa	2.00g
- Sacarosa	2.00g
- Glucosa	0.20g
- Tiosulfato de Sodio	0.06g
- Sulfato férrico	0.04g
- Cloruro de sodio	0.02g
- Rojo de fenol	0.0046g
- Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05	10.0 mL

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciómetro y ajustar el pH de 7.10 ± 0.01.

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µm esteril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa ennegrecimiento dentro del micropozo

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio

Reacción de la Ureasa de Christensen:

Ingredientes:

- Peptona	0.002g
- Cloruro de sodio	0.010g
- Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	0.004g
- Glucosa (dextrosa)	0.002g
- Urea (20%)	4.00g
- Rojo de fenol	0.0026g
- Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05	10.0 mL

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada, No calentar por que se descompone la Urea.

Tomar el pH con un potenciómetro y ajustar el pH de 6.80 ± 0.01.

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µm esteril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reaccion positiva (+): cambio de color del medio a un naranja intenso a rojo rosado intenso

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio naranja tenue

Utilización de Citrato de Simmons:

Ingredientes:

- Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.004g
- Monofosfato de amonio (NH ₄)H ₂ PO ₄	0.02g
- Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	0.02g
- Citrato de sodio	0.04g
- Azul de Bromotimol	0.0016g
- Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05	10.0 mL

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciómetro y ajustar el pH de 6.93 ± 0.0.

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µm esteril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color verde bandera fuerte a un azul intenso.

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio verde tenue

Prueba de la β-galactosidasa (ONPG):

Ingredientes:

- Agua peptonada	
Peptona (neopeptona)	0.20g
Cloruro de sodio	0.10g
Agua destilada	10.0 mL
- Solución ONPG	
ONPG	0.12g
Agua destilada	10.0 mL

Preparación:

Buffer de fosfato de sodio 0.01M pH 7.5: adicionar 1.38 g de Na₂HPO₄, a 10 mL de agua destilada, disolver y mezclar. Ajustar pH con solución de hidróxido de sodio 5N.

Solución ONPG: se disuelve a temperatura ambiente y se esteriliza por filtración con membrana millipore de 0.45 µm. cubrir el tubo con papel aluminio para evitar la exposición de la luz.

Agua peptonada: se colocan los ingredientes en un matraz erlenmeyer de 50 mL y se disuelve por calentamiento, se ajusta el pH = 8.0 a 8.4. Hervir 10 minutos aproximadamente, filtrar y reajustar el pH 7.40. Esterilizar por autoclave 115 °C por 20 minutos.

Asépticamente se adiciona 1 parte de solución ONPG y 3 partes de agua peptonada, en un tubo estéril. Se cubre el tubo con papel aluminio.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa una coloración de ligeramente amarilla a amarilla

Reacción negativa (-): incoloro

Descarboxilacion de aminoácidos

Lisina Descarboxilasa:

Ingredientes:

- | | |
|----------------------------------|---------|
| - L-Lisina (2%) | 0.4g |
| - Base de Mouller (BBL) | 0.210g |
| - Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05 | 10.0 mL |

Preparación:

Disolver la Base de Mouller en el agua destilada, calentar si es necesario.

Dejar enfriar. Adicionar aminoácido L-Lisina

Tomar el pH con un potenciómetro y ajustar el pH de 5.93 ± 0.01.

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µm estéril y un tubo estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color violeta intenso o violeta tenue

Reacción negativa (-): un color amarillo tenue o no hay cambio del medio lila tenue

Ornitina Descarboxilasa:

Ingredientes:

- | | |
|----------------------------------|---------|
| - L-Ornitina (2%) | 0.4g |
| - Base de Mouller (BBL) | 0.210g |
| - Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05 | 10.0 mL |

Preparación:

Disolver la Base de Mouller en el agua destilada, calentar si es necesario.

Dejar enfriar. Adicionar aminoácido L-Ornitina

Tomar el pH con un potenciómetro y ajustar el pH de 5.95 ± 0.01.

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µm estéril y un tubo estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color violeta intenso o violeta tenue

Reacción negativa (-): un color amarillo tenue o no hay cambio del medio lila tenue

Arginina Descarboxilasa:

Ingredientes:

- | | |
|----------------------------------|---------|
| - Arginina (2%) | 0.4g |
| - Base de Mouller (BBL) | 0.210g |
| - Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05 | 10.0 mL |

Preparación:

Disolver la Base de Mouller en el agua destilada, calentar si es necesario.

Dejar enfriar. Adicionar aminoácido Arginina

Tomar el pH con un potenciómetro y ajustar el pH de 5.91 ± 0.01.

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µm estéril y un tubo estéril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color violeta intenso o violeta tenue

Reacción negativa (-): un color amarillo tenue o no hay cambio del medio lila tenue

Lisina Descarboxilasa:

Ingredientes:

- | | |
|----------------------------------|---------|
| - DL-Fenilalanina (2%) | 0.4g |
| - Extracto de levadura | 0.06g |
| - Glucosa (dextrosa) | 0.02g |
| - Rojo de fenol | 0.0004g |
| - Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05 | 10.0 mL |

Preparación:

Disolver los ingredientes con el agua destilada, calentar suavemente, hasta completa disolución.

Tomar el pH con un potenciómetro y ajustar el pH de 6.55 ± 0.01.

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µm esteril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reactivo para revelar la reacción

Reactivo de Cloruro ferrico (FeCl₃) al 10%

Adicionar dos gotas del reactivo al micropozo

Reacción positiva (+): se observa un color verde a verde oscuro

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio o del reactivo, nranja ambos

Utilización de Malonato:

Ingredientes:

- Malonato de sodio		0.06g
- Extracto de levadura		0.02g
- Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	0.04g	
- Fosfato de potasio (K ₂ HPO ₄)	0.012g	
- Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)		0.008g
- Cloruro de sodio (NaCl)	0.04g	
- Glucosa (dextrosa)		0.0050g
- Azul de bromotimol		0.0006g
- Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05	10.0 mL	

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciómetro y ajustar el pH de 6.80 ± 0.1.

Esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 minutos o por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 µm esteril.

Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de 35 °C ± 2 °C por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color verde tenue a un azul intenso.

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio ligeramente amarillo

Fermentación de Carbohidratos (GLU, ADO, ARA, DUL, INO, LAC, MAN, MEL, RAM, MAL, RAF, SAC, SAL, SOR, TRE, XIL):

Ingredientes:

- Peptona de caseína		0.2g
- Cloruro de sodio		1.0g
- Carbohidrato (1.5%)		0.30g
- Rojo de fenol		0.0004g
- Agua destilada pH = 7.0 ± 0.05	10.0 mL	

Preparación:

Pesar exactamente las cantidades, disolver con agua destilada y calentar suavemente hasta ebullición.

Dejar enfriar y tomar el pH con un potenciómetro

Carbohidrato	pH	Carbohidrato	pH	Carbohidrato	pH
Glucosa (GLU)	7.42	Inocitol (INO)	7.25	Rafinosa (RAF)	7.36
Lactosa (LAC)	7.25	Manitol (MAN)	7.23	Sacarosa (SAC)	7.25
Adonitol (ADO)	7.25	Melibiosa (MEL)	7.23	Salicina (SAL)	7.41
Arabinosa (ARA)	7.29	Maltosa (MAL)	7.25	Trehalosa (TRE)	7.13
Dulcitol (DUL)	7.25	Ramnosa (RAM)	7.22	Xilosa (XIL)	7.23

Esterilizar por filtración mediante un filtro millipore con membrana de 0.45 μm esteril.
Realizar la prueba de esterilidad colocando el medio en estufa a una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Interpretación:

Reacción positiva (+): se observa un color amarillo tenue a amarillo fuerte

Reacción negativa (-): no hay cambio del medio o se observa un color rosa-rojizo

Solución salina 0.85% estéril:

Pesar 0.85 g de Cloruro de sodio, disolver en agua y llevar a volumen de 100 mL, esterilizar en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

Cámara de humedad

Caja pequeña de polietileno de alta densidad, con un vaso de agua dentro de la caja.

ANEXO 2 ELABORACION DE REACTIVOS REVELADORES

❖ Determinación de Nitratos

Reactivo A: α -naftilamina 0.5%

Disolver 0.5 g de α -naftilamina, en una solución de ácido acético 5N y llevar a volumen en un matraz volumétrico de 100 mL, mezclar.

Reactivo B: Ácido Sulfanílico 0.8%

Disolver 0.8 g de ácido sulfanílico en una solución de ácido acético 5N y aforar en un matraz volumétrico de 100 mL, mezclar.

Ambos reactivos conservarlos en recipiente de color ambar, bien rotulados.

❖ Determinación de Voges-Proskauer

Reactivo 1) α -naftol al 5%

Disolver 5 g de α -naftol en alcohol etílico absoluto, en un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con el mismo disolvente, mezclar.

Reactivo 2) Hidróxido de Potasio (KOH), al 40%, agente oxidante.

Disolver 40 g de hidróxido de potasio en agua destilada y aforar a 100 mL en un matraz volumétrico.

❖ Determinación de Indol

Reactivo de Erlich

Disolver 2g de p-dimetilamino-benzaldehido en 140 mL de alcohol etílico absoluto, adicionar lentamente 40 mL de ácido clorhídrico concentrado.

❖ Determinación de Fenilalanina

Reactivo de Cloruro Férrico (FeCl_3) al 10%

Adicionar 10g de cloruro férrico, en un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con agua y llevar a volumen con el mismo disolvente, mezclar.

ANEXO 3 FUNDAMENTO DE MEDIOS DE CULTIVO.

AGUA PEPTONADA.

Composición (g / litro):

Peptona de carne	10.0
Cloruro de sodio	5.0

pH final 7.2 ± 0.2 .

Medio utilizado como diluyente, además para enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario. Recomendado para ser utilizado en lugar de solución fisiológica para recuperar células de enterobacterias dañadas por procesos fisicoquímicos a que ha sido sometido el alimento.^{23, 30}

AGAR BAIRD PARKER:

Composición (g / litro):

Peptona de caseína	10.0
Extracto de carne	5.0
Extracto de levadura	1.0
Piruvato de sodio	10.0
Glicina	12.0
Cloruro de litio	5.0
Agar - agar	15.0

pH final 6.8 ± 0.2 .

Medio para aislamiento y diferenciación de estafilococos en alimentos y materiales farmacéuticos. Este medio de cultivo contiene cloruro de litio y telurito para la inhibición de la flora acompañante, en tanto que el piruvato y la glicina actúan favoreciendo selectivamente el crecimiento de estafilococos. Sobre el medio de cultivo, opaco por su contenido en yema de huevo, las colonias de estafilococos muestran dos características: por lipólisis y proteólisis, se producen halos y anillos característicos y, debido a la reducción del telurito a telurio, se desarrolla una coloración negra. La reacción con la yema de huevo y la reducción

del telurito se presentan en notables paralelismo con la coagulasa-positiva y, por tanto, utilizarse como índice de ésta última.^{23, 30}

Interpretación:

Microorganismos	Colonias
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negras, luminosas, convexas, con borde estrecho blanquecino, rodeada por un halo claro de 2 – 5 mm de diámetro
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negras, luminosas, pero de forma irregular. Zona opaca alrededor
<i>Micrococcus</i>	Colonias marrones a negras.
<i>Bacillus</i>	Pardo-oscuro, mates, presencia a veces de un halo de precipitación
<i>Levaduras</i>	Blancas, sin halos de clarificación

CALDO INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN (BHI):

Composición (g / litro):

Infusión de cerebro	12.5
Infusión de corazón	5.0
Proteosa – peptona	10.0
D(+) – glucosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato monobásico	2.5

pH final 7.4±0.2.

Medio adecuado para el cultivo de bacterias exigentes como estreptococos, neumococos y otros microorganismos de difícil desarrollo. Los nutrientes de este caldo son muy apropiados para los hemocultivos, ya que en esta infusión se desarrollan todas las especies de estreptococos excepto los tior y piridoxal dependientes. Los estreptococos que crecen en esta infusión suelen dar mejores reacciones en la prueba de coagulasa. Con el agregado de 20 UI de penicilina y 100 g/ml de amikacina, se inhibe la flora bacteriana cuando se utiliza este medio para el cultivo de hongos patógenos.²³

Interpretación:

Microorganismo	Recuperación
<i>Neisseria meningitidis</i>	Buena a excelente
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Buena a excelente
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Buena a excelente

CALDO SELENITO CISTINA:**Composición (g / litro):**

Peptona de caseína	5.0
L(-)-Cistina	0.01
Lactosa	4.0
di-sodio hidrogenofosfato	2.0
Selenito de sodio	4.0

pH final 7.0±0.2.

Para enriquecimiento de *Salmonella* a partir de heces, alimentos y otros materiales. El selenito inhibe el crecimiento de bacterias coliformes y enterococos en las primeras 6-12 horas que siguen al inicio de la incubación. Después, el efecto inhibitorio disminuye lentamente. Por lo contrario, *Salmonella*, *Shigella*, *Shigella sonnei*, *Proteus* y *Pseudomonas* apenas son inhibidos.^{23, 30}

Interpretación:

Microorganismos	Recuperación
<i>Salmonella thyphymurium</i>	Buena
<i>Salmonella cholerasuis</i>	Buena
<i>Salmonella typhi</i>	Buena
<i>E. coli</i>	Sin/ poco crecimiento

CALDO TETRATIONATO:

Composición (g / litro):

Peptona de caseína	2.5
Peptona de carne	2.5
Mezcla de sales biliares	1.0
Carbonato de calcio	10.0
Tiosulfato de sodio	19.0

pH 8.4±0.2.

Aditivos: yoduro de potasio 5.0, yodo 6.0, verde brillante 0.01

Para el enriquecimiento de *Salmonella*, a partir de diversos materiales de investigación. El tetrionato reprime a coliformes y a otras bacterias de acompañamiento, en parte por acción conjunta con el tiosulfato excedente. En cambio, todas las bacterias reductoras de tetrionato, como, por ejemplo, *Salmonella* y *Proteus*, pueden multiplicarse más o menos sin obstáculos. El ácido procedente de la reducción del tetrionato es neutralizado por el carbonato de calcio. Las sales biliares inhiben considerablemente a todos los microorganismos de presencia no obligatorio en el intestino. La adición de Verde brillante sirve, sobre todo, para reprimir a la flora gram-positiva. Dado que el medio con Verde brillante poseen un efecto inhibitor muy intenso, resulta ventajoso a veces suprimir la adición de Verde brillante a fin de obtener un rendimiento satisfactorio de *Salmonella*.²³

Interpretación:

Microorganismos	Crecimiento
<i>Salmonella typhi</i>	Bueno- excelente
<i>Salmonella thyphymurium</i>	Bueno-excelente
<i>Escherichia coli</i>	Escaso

AGAR SS (Salmonella Shigella):

Composición (g / litro): Extracto de carne	5.0
Peptona de carne	5.0
Lactosa	10.0
Bilis de buey desecada	8.5
Citrato de sodio	10.0
Tiosulfato de sodio	8.5
Citrato de hierro (III)	1.0
Verde brillante	0.003
Rojo neutro	0.025
Agar – agar	12.0

pH final 7.0±0.1

Medio para aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* a partir de heces, alimentos y otro materiales de objeto de investigación. El Verde brillante, la bilis de buey y la elevada concentración de tiosulfato y de citrato inhiben considerablemente la flora de acompañamiento. Con el tiosulfato iones hierro se pone de manifiesto la formación de sulfuro por el ennegrecimiento de las correspondientes colonias. Las colonias de coliformes quedan señaladas por la demostración de la degradación de lactosa a ácido, a cargo del indicador de pH Rojo neutro.²³

Interpretación:

Microorganismos	Colonias
<i>Shigella, Salmonella</i>	Incoloras, transparentes
<i>Proteus, Salmonella</i>	Transparentes con centro negro
<i>Escherichia coli</i>	Rosadas hasta rojas
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Rosadas hasta color cremoso- blanquecinas

AGAR DNAsa:

Composición (g / litro):

Peptona de caseína	15.0
Peptona de soya	5.0
Ácido desoxirribonucleico	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar – agar	15.0

pH final 7.3 ± 0.2

El agar DNAsa es un medio sólido diferencial usado para determinar la producción de desoxirribonucleasa por *S. aureus*, *Serratia marcescens* y otros microorganismos. La adición de HCl después de la incubación del medio da una coloración amarilla si la despolimerización del DNA sucedió.