



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Control de calidad de algunas cepas de la familia
Enterobacteriaceae

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Charbel Felipe Vargas García

Director de tesis: Dr. José Luís Alfredo Mora Guevara

Asesor de tesis: Mtra. Yolanda Flores Cabrera

Lugar de desarrollo:

Laboratorio No. 1 Primero Piso U.M.I.E.Z.

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM



México, CDMX 2018



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por haber sido mi segunda casa y haberme brindado una educación de calidad durante 5 años así como todos los medios materiales para poder culminar esta etapa de mi vida.

Al Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara y a la Mtra. Yolanda Flores Cabrera por sus asesorías, conocimientos, orientación y dedicación, los cuales fueron vitales para poder culminar esta tesis.

Al Dr. Rubén Marroquín Segura y al Prof. Armando Ramírez González por su gran apoyo y su buen humor que compartían con todo el laboratorio.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi mamá María Clara Carmen García Cabrera quien durante mis 26 años de vida nunca escatimó en esfuerzo y gastos para darme la mejor calidad de vida y la mejor educación posible.

A mis Hermanos Edith, Mirna, Aida y Pablo que siempre me apoyaron tanto emocional como económicamente para poder culminar mis estudios universitarios y los cuales jamás me dejaron solo en ningún momento.

A mi abuela y cuñados que siempre supieron darme un excelente consejo y palabras de aliento.

A mis amigos más cercanos que siempre me expresaron elogios con respecto a mi desempeño académico.

A mis maestros quienes siempre me ayudaron a generar nuevos conocimientos, y que siempre depositaron su esperanza en mí.

A mis sinodales quienes revisaron y aprobaron mi tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	3
Introducción a la Microbiología	3
Bacterias.....	3
Metabolismo de bacterias.....	4
Cepas ATCC	6
Medios de Cultivos	7
Tinciones	8
Tinción de Gram.....	9
Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	10
Metabolismo de la Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
<i>Escherichia coli</i>	13
<i>Serratia marcescens</i>	14
<i>Salmonella enteritidis</i>	15
Conservación de cepas bacterianas	16
Conservación a corto plazo:.....	16
Conservación a mediano plazo:.....	17
Conservación a largo plazo:.....	18
Crioconservación	19
Escala Nefelométrica de Mc Farland	21
Fundamentos de las Pruebas Bioquímicas	22
Prueba Agar ChromID CPS.....	22
Prueba Agar Salmonella-Shigella.....	24
Prueba Agar Eosine Methylene Blue (EMB).....	25
Prueba Agar Brain Heart Infusion (BHI).....	26
Prueba Citrato de Simmons.....	27
Prueba Lysine-Iron-Agar (LIA).....	29
Prueba Kligler-Iron-Agar (KIA).....	31
Prueba Methyl Red / Voges-Proskauer (MR-VP).....	32
Recuento microbiano por vertido en placa	33
PLANETAMIENTO DEL PROBLEMA	34
OBJETIVO GENERAL	34

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
HIPÓTESIS	35
DISEÑO EXPERIMENTAL	35
VARIABLES	35
MATERIAL	35
MEDIOS DE CULTIVO	36
CEPAS	37
MÉTODOS	38
Identificación inicial de las 4 cepas de Enterobacterias mediante el VITEK2	38
Reconstitución de las 4 cepas de Enterobacterias	39
Micrométodo de criopreservación Zaragoza	39
Prueba de conservación a diferentes temperaturas	40
Prueba de viabilidad mensual por un lapso de seis meses	41
Tinción de Gram	41
Pruebas Bioquímicas	42
RESULTADOS	48
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	70
CONCLUSIONES	78
PERSPECTIVAS	78
REFERENCIAS	79

RESUMEN

La creciente demanda social de productos biotecnológicos han llevado a la gran utilización de cepas ATCC, el alto costo de este tipo de cepas ha originado la necesidad de implementar un nuevo métodos de conservación de microorganismos, que mantenga inalteradas sus características bioquímicas, su viabilidad y que eviten su contaminación. La crioconservación es una técnica que ayuda a mantener integras las estructuras de los microorganismos a bajas temperaturas, teniendo así en este presente trabajo, la implementación del micrométodo de crioconservación Zaragoza para las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Salmonella enteritidis* pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*; Así como la verificación de la viabilidad y de las características bioquímicas de dichas cepas. Posterior a la implementación del micrométodo de crioconservación, se probó durante seis meses la viabilidad de dichas Enterobacterias almacenadas a tres diferentes temperaturas (-24 °C, 4 °C y Temperatura ambiente) utilizando la técnica de vertido en placa de manera mensual, también se realizaron siembras de las Enterobacterias crioconservadas en medios selectivos y cromogénicos para poder observar su morfología colonial, así como tinciones de Gram para observar sus morfología microscópica y por último se llevaron a cabo las pruebas bioquímicas LIA, KIA, MIO, Citrato de Simmons, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y fermentación de carbohidratos al inicio y al final de los 6 meses de prueba. Obteniéndose que las características bioquímicas de las 4 Enterobacterias habían permanecido inalteradas gracias a la implementación del micrométodo de crioconservación Zaragoza, y en el caso de la prueba de viabilidad, las cepas se mantenían viables durante los 6 meses para las temperaturas de almacenamiento de -24 °C, para la temperatura de 4 °C a partir del 5 mes se disminuía la carga microbiana y siendo que para la temperatura ambiente la viabilidad de las cepas se veía alterada a partir del 3er mes de prueba. En conclusión siendo este un método efectivo para la conservación de cepas de la familia *Enterobacteriaceae* a una temperatura de almacenamiento de -24 °C hasta por 6 meses.

INTRODUCCIÓN

Los procesos que involucran a los microorganismos han sido explotados empíricamente por la humanidad desde hace siglos. Empezando desde la producción de bebidas alcohólicas (cerveza, vinos, licores, etc.), la preparación de alimentos ricos en nutrientes como es el pan o los derivados de la leche tales como el yogurt y los quesos. Dejando de fuera el ámbito empírico y tomando un camino científico los microorganismos en los últimos siglos han tenido un auge muy fuerte en la producción de medicamentos biotecnológicos, tales como son la insulina en el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo II , en la producción de antibióticos para contrarrestar las infecciones bacterianas y en este último siglo la demanda de productos más amigables con el ambiente han propiciado la producción de biofertilizantes para contrarrestar plagas en plantíos y bioplásticos para poder disminuir la utilización de polímeros derivados del petróleo, todo esto empleando bacterias y otro microorganismos a nivel industrial con el fin de disminuir el impacto ambiental creciente en los últimos años.

Los antecedentes antes mencionados y la creciente demanda social de nuevos productos biotecnológicos han llevado a la enorme utilización de cepas ATCC, el alto costo de este tipo de cepas y su alta demanda ha originado la necesidad de implementar un nuevo métodos de conservación de cepas, que mantenga las características bioquímicas de los microorganismos y nos permita evitar contaminación de las mismas así como prolongar su vida sin la necesidad de estar utilizando técnicas de resiembra periódica. Actualmente el empleo de agentes crioprotectores tales como DMSO, glicerina, leche descremada, ácido ascórbico, dextrosa en las técnicas de conservación han sido de gran ayuda para el área clínica e industria puesto que estos agentes protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas por efecto de la deshidratación o durante el proceso de la congelación.

La necesidad de mantener las propiedades de las cepas microbianas que los hacen importantes como sus características bioquímicas, la morfología microscópica y macroscópica, la viabilidad de dichas cepas, su pureza y estabilidad no es fácil por

métodos de conservación convencionales. En el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (U.M.I.E.Z) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, se adaptó un micrométodo de crioconservación para Enterobacterias, con el fin de corroborar que este método es confiable, la implementación de controles de calidad para verificar la viabilidad de las cepas, su pureza y poder garantizar la preservación de sus características bioquímicas es de vital importancia. En este proyecto se realizarán pruebas para verificar su viabilidad y la estabilidad bioquímica de las cepas en estudio y poder así asegurar la calidad de las bacterias crioconservadas.

MARCO TEÓRICO

Introducción a la Microbiología

La Microbiología es la ciencia que estudia los organismos microscópicos, deriva de 3 raíces griegas: mikros (pequeño), bios (vida) y logos (ciencia) que significan el estudio de la vida microscópica. Estos microorganismos se encuentran en una estrecha asociación con todos los tipos de organismos multicelulares. Miles de millones habitan en un cuerpo humano sano, como simples inquilinos o como integrantes de las funciones corporales. Siendo principalmente considerados como microorganismos a las bacterias, hongos, protozoos, helmintos y virus. Teniendo más interés en aquellos que son perjudiciales para el hombre, llamados patógenos. Los organismos procariontes se clasifican como bacterias, mientras que entre los eucariontes se incluyen los hongos, los protozoos y los helmintos, así como los seres humanos. ⁴

Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares procariontes, esto quiere decir que están formados por una sola célula sin núcleo definido, donde su material genético se encuentra delimitado por una membrana fina llamada nucleoide y no tienen orgánulos como mitocondria, cloroplasto o aparato de Golgi. A pesar de su sencilla organización celular cuentan con una pared celular (capa de polisacáridos) que envuelve la célula proporcionándole rigidez y protección. Son tan pequeñas que es

imposible verlas a simple vista miden de 0.1 μm a 10 μm . Se reproducen asexualmente por medio de una forma de división celular denominada fisión binaria, que produce copias genéticamente idénticas a la célula original. En condiciones ideales algunas bacterias se duplican en cuestión de minutos por lo que podrían en principio dar origen a una población de millones de bacterias en poco tiempo. ¹

Bacterias típicas: la mayoría de géneros bacterianos que poseen metabolismo definido y presentan características morfológicas como pared celular y material genético.

Bacterias atípicas: Son procariontes que carecen de los componentes estructurales característicos o de las capacidades metabólicas de las bacterias típicas.

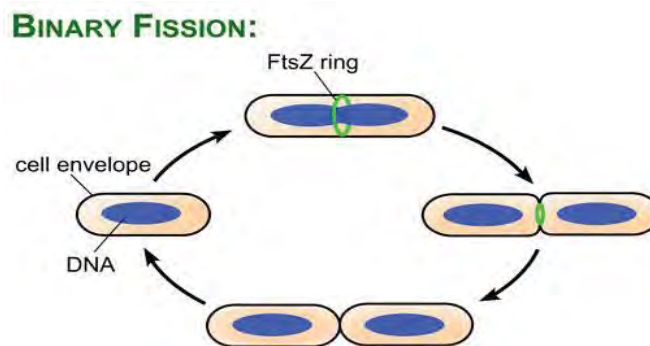


Imagen 1.- Reproducción bacteriana por fisión binaria

Metabolismo de bacterias

La multiplicación celular es una consecuencia directa del crecimiento y da lugar, en el caso de las bacterias a colonias. Los procesos sintéticos involucrados en el crecimiento bacteriano incluyen más de 2 000 reacciones bioquímicas. ²

Las principales funciones del metabolismo son:

- Formar las subunidades que luego serán utilizadas en la síntesis de macromoléculas.
- Proporcionar la energía necesaria para todos aquellos procesos que la requieran como transporte activo, movilidad, biosíntesis, etc.

El metabolismo de las bacterias es muy complejo, mediante unas dos mil reacciones metabólicas la bacteria puede sintetizarse a sí misma y puede generar energía para procesos como transporte activo, motilidad y otros procesos. Los distintos tipos de metabolismo microbiano pueden clasificarse según tres criterios distintos.

1) Según como el organismo obtiene el Carbono para la construcción de la masa celular:

- Autótrofo: a partir de CO₂
- Heterótrofo: de compuestos orgánicos

2) Según como el organismo obtiene los equivalentes reductores para la conservación de energía:

- Litotrofo: de compuestos inorgánicos
- Organotrofo: de compuestos orgánicos.

3) Según la forma en la que el organismo obtiene la energía para vivir y crecer.

- Quimiótrofo: compuestos químicos externos.
- Fotótrofo: de la luz

El metabolismo se divide en dos clases de reacciones:

- **Catabolismo:** consiste en la degradación enzimática de macromoléculas como lípidos, hidratos de carbono y proteínas que el organismo obtiene del entorno en que vive o de sus propias sustancias de reserva. Esta degradación se acompaña de la liberación de una gran cantidad de energía.
- **Anabolismo:** Es el proceso inverso, es la síntesis enzimática de macromoléculas a partir de compuestos sencillos, con consumo de energía. Es decir, a partir de moléculas sencillas y de bajo contenido energético se sintetizan macromoléculas complejas en energía. ³

Cepas

Una Cepa es una variante fenotípica de una especie o de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus

cualidades definitorias. Esta también puede definirse como un conjunto de especies bacterianas que comparten, al menos, una característica.

También es denominada como un conjunto de células homogéneas, o clones, que deriva de la reproducción de una célula inicial única, seleccionada y aislada. También suele referirse a las cepas como colonias puras de bacterias.⁶

Cepas puras

Se llaman cepas puras aquellas en las que se encuentran correctamente identificado su género, especie (en algunos casos subespecie) y se tiene certeza de que no está contaminada de agentes inorgánicos ajenos a la cepa o que no se encuentra invadida por otro tipo de microorganismos.⁸

Ya teniendo la cepa aislada, identificada y libre de contaminantes inorgánicos o de otras cepas, un aspecto importante es la conservación de dicha cepa. La conservación de la cepa se obtiene bajando el ritmo o deteniendo la actividad metabólica de las células, esta operación puede ser efectuada disminuyendo drásticamente el agua disponible y esto se puede lograr a través de:

- Liofilización
- Congelamiento a -20 °C.^{6,7}

Cepas ATCC

American Type Culture Collection es una organización norteamericana de materiales, recursos y estándares biológicos que su misión va enfocadas a la adquisición, autenticación, producción, preservación, desarrollo y distribución de estándares de referencia de microorganismos, líneas celulares y otros materiales. Al mismo tiempo que mantiene materiales de colección tradicionalmente, ATCC desarrolla productos de alta calidad, estándares y servicios para soportar investigación científica y a través de esto mejorar la salud global de la población. Las cepas ATCC son ampliamente utilizadas en procesos biotecnológicos, en el control de calidad o para la calibración de equipos de identificación microbiológica, cada cepa esta pura de contaminantes, manteniendo sus características

bioquímicas y viabilidad del microorganismo, se identifican estas cepas por una clave numérica específica recabadas en un catálogo.⁹

Medios de Cultivos

Es un método para la multiplicación de microorganismos, tales como bacterias, hongos y virus, en el que se prepara un medio de cultivo óptimo que contenga los requerimientos mínimos necesarios (carbohidratos, lípidos, proteínas, factores de crecimiento, minerales, vitaminas, indicadores, colorantes, etc.) para que el microorganismo se vea favorecido en su crecimiento. Un medio de cultivo es empleado como un método fundamental para el aislamiento, crecimiento y estudio de las bacterias así como de otros microorganismos que son patógenos para el ser humano u otros seres vivos.

Los medios de cultivos son muy variados debido a los diferentes sustratos que contienen, estos permiten el crecimiento e identificación microbiana como se visualiza en la imagen 2, esos medios para su clasificación se dividen por su composición en:

- **Básicos:** Contienen los nutrientes mínimos necesarios para organismos poco exigentes.
- **Enriquecidos:** Es un medio básico complementado con nutrientes adicionales.
- **Selectivos:** Medio que permite el crecimiento de un solo tipo de microorganismos inhibiendo el crecimiento de otros.
- **Diferenciales:** Son medios selectivos a los cuales se les agregaron sustancias o moléculas específicas y además poseen un indicador para saber por el viraje si se dio o no la reacción.

Para obtener cultivos puros los métodos más utilizados son:

- El aislamiento por estrías simples para muestras con poca cantidad de microorganismos.
- Aislamiento por estría cruzada

- Aislamiento por vertido en placa
- Aislamiento por diluciones ¹⁷



Imagen 2.- Diferentes medios de cultivo utilizados para el aislamiento bacteriano

Tinciones

Las tinciones son utilizadas ampliamente en microbiología con el fin de identificar ciertas estructuras características de algunos microorganismos, en dichas tinciones se utilizan colorantes para que estos interactúen con las estructuras a teñir mediante sus características ácido-base

Los colorantes se dividen en 3 grupos:

- **Básicos:** interactúan con estructuras ácidas como núcleos y nucléolos.
- **Ácidos:** interactúan con estructuras básicas como el citoplasma o citosol.
- **Neutros:** conformados por un colorante básico y un ácido dando lugar a una sal.

Las tinciones por el número de colorantes que utilizan se clasifican en:

- **Simples:** solamente se emplea un colorante.
- **Diferenciales:** utiliza un colorante primario y un segundo colorante de contraste.
- **Específicas:** tiñen estructuras específicas del microorganismo.

Tinción de Gram

La tinción de Gram, también conocida como coloración de Gram, es una técnica de laboratorio que se utiliza rutinariamente en los estudios microbiológicos de las bacterias. Fue diseñada por Christian Gram, un científico danés, en el año 1884. El objetivo de Gram era conseguir una prueba con la que fuera posible diferenciar grupos de bacterias para así poder estudiarlas y clasificarlas.

La técnica se basa en aplicar una serie de colorantes a una muestra de cualquier origen, que supuestamente contenga bacterias no identificadas. El colorante primario es el cristal violeta, se coloca el colorante en la preparación fija y, tras un minuto, se enjuaga el resto de colorante y se coloca el mordiente de la tinción que es el lugol (solución iodo-yoduro) formándose un complejo del iodo con el cristal violeta el cual queda atrapado en la gruesa pared de peptidoglucanos y ácidos lipoteicoicos de algunas bacterias, quedando estas de color morado, estas bacterias son denominadas Gram positivas, posteriormente se procede enjuagar la preparación con una mezcla 1:1 alcohol-acetona durante 15 segundos, después el exceso de colorante se elimina con agua corriente y se coloca el colorante de contraste (safranina u otro colorante diferente del cristal violeta), este colorante queda atrapado en la membrana externa lipídica que tienen algunas bacterias, quedando estas de color rosado siendo denominadas como bacterias Gram negativas, como se aprecia en la imagen 3 donde podemos ver una preparación con mezcla de bacterias tanto Gram positivas así como Gram negativas.¹⁸

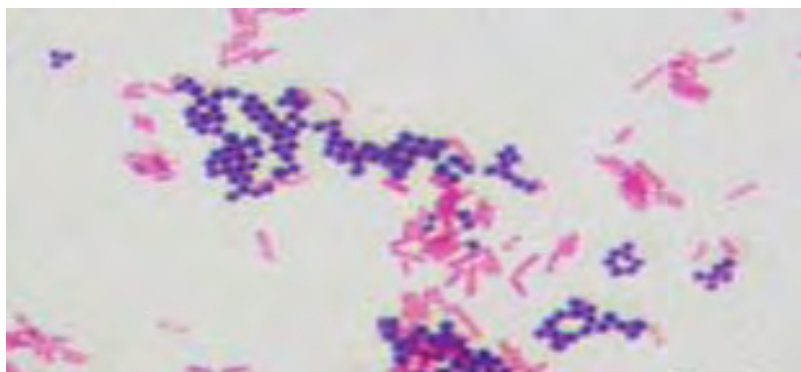


Imagen 3.- Bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (violeta) y la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* (rosado).

Bacilos

La palabra bacilo se usa para describir cualquier bacteria con forma de barra o vara, y pueden encontrarse en muchos grupos taxonómicos diferentes tipos de bacterias. El otro nombre Bacilli(plural en latín); hace referencia a una clase de bacterias que incluyen dos órdenes, uno de los cuales contiene al género *Bacillus*.

Los bacilos son bacterias que se encuentran en diferentes ambientes y solamente se pueden observar con un microscopio.

Los bacilos se suelen dividir en:

- **Bacilos Gram positivos:** fijan el cristal violeta (tinción de Gram) en la pared celular porque tienen una gruesa capa de peptidoglucanos.
- **Bacilos Gram negativos:** no fijan el cristal violeta y se tiñen con el colorante de contraste el cual es en este caso la safranina, debido a que tienen una fina capa de peptidoglucanos en medio de dos bicapas lipídicas en la cual se encuentran los lipopolisacáridos o también llamados endotoxinas (principalmente en la membrana externa).¹⁰

Familia *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* es la mayor de las familias. Contiene bacilos Gram negativos anaerobios facultativos rectos, inmóviles o con flagelos peritricos, con necesidades nutricionales sencillas. El orden *Enterobacterial* contiene solamente una familia, *Enterobacteriaceae*, con 44 géneros. Son llamadas *Enterobacterias* porque con frecuencia se encuentran en el aparato digestivo de animales y humanos pero algunas especies también viven en la tierra y en el agua.

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro como en otras bacterias Gram negativas, su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas; la capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un

espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas la membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) (en la parte más externa, son un importante factor de virulencia de estas bacterias), lipoproteínas (que están fijadas al peptidoglucano), proteínas porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos) y otras proteínas de la membrana externa. Entre estas proteínas hay algunos organelos complejos que irradian hacia el exterior: los flagelos, estructuras que se utilizan para la locomoción y que provienen de una estructura basal localizada en la membrana interna, las fimbrias (o pili comunes), con importante función como adhesinas y los pili sexuales, estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido. El LPS tiene tres dominios principales: el esqueleto de lípido A, el oligosacárido fosforilado central (core) y las cadenas laterales de oligosacárido de repetición. El lípido A, también conocido como endotoxina, es la parte biológicamente activa de la molécula que el huésped reconoce. El oligosacárido de repetición unido al LPS se conoce como antígeno O. Este antígeno es la base para la clasificación de los serogrupos. Junto con otros factores, la presencia del antígeno O media la resistencia bacteriana al efecto bactericida del suero normal, siendo capaces por tanto de sobrevivir más tiempo en sangre y causando infecciones hematógenas, diseminadas y más graves. ¹¹

Metabolismo de la Familia *Enterobacteriaceae*

Las propiedades metabólicas de *Enterobacteriaceae* son muy útiles en la caracterización de los géneros que contiene. Los miembros de esta familia, a menudo denominados enterobacterias o bacterias entéricas, degradan azúcares mediante la vía Embed-Meyerhof y utilizan el ácido pirúvico para producir ácido fórmico. La familia *Enterobacteriaceae* puede dividirse en dos grupos, en función de sus productos de fermentación. La mayoría (p.ej., los géneros *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella*) llevan a cabo una fermentación ácido mixta y producen principalmente lactato, acetato, succinato, formato y etanol. A diferencia de

Klebsiella, *Enterobacter*, *Serratia* y *Erwinia* son fermentadores de butanodiol. En este tipo de fermentaciones los productos principales son butanodiol, etanol y dióxido de carbono. Los dos tipos de fermentación se distinguen por las pruebas rojo de metilo y Voges- Proskauer como se observa en la imagen 4. ¹²



Imagen 4.- Rutas metabólicas de la fermentación de la glucosa que realizan los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella spp es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. Forma parte de la flora del tracto gastrointestinal, pero actúa como patógeno oportunista provocando neumonía; al lograr entrar en los pulmones. Las infecciones causadas por este microorganismo afectan a pacientes con enfermedades subyacentes como la diabetes o alcohólicos y fumadores crónicos. Los miembros del género *Klebsiella spp* son bastoncillos Gram negativos cortos, inmóviles en forma de varilla, encapsuladas. La cápsula que cubre una célula de *Klebsiella* le ayuda a ser resistente a muchos antibióticos, podemos visualizar la capsula de *K.pneumoniae* en la imagen 5 donde se aprecian halos transparentes alrededor de la bacteria. ²⁰

El género *Klebsiella* presenta dos especies patógenas *klebsiella pneumoniae* y *klebsiella oxytoca*. Los miembros de del genero *Klebsiella* son microorganismos entéricos, células aisladas que fermentan la lactosa, descarboxilan la lisina pero no

la ornitina. *Klebsiella pneumoniae* es notable por qué forma colonias mucoides de gran tamaño, húmedas debido a la presencia de material capsular. ¹⁹

K. pneumoniae es inmóvil, indol negativo, MR positivo, VP negativo, crece en medio de citrato pero no en medio de KCN, no produce sulfuro de hidrógeno, pero da positiva la prueba de la lisina descarboxilasa ^[9]. En agar Mac Conkey fermenta la lactosa y forma colonias mucoides, mientras que en agar XLD se observan colonias amarillas Y en agar verde brillante colonias amarillas intenso. ²¹

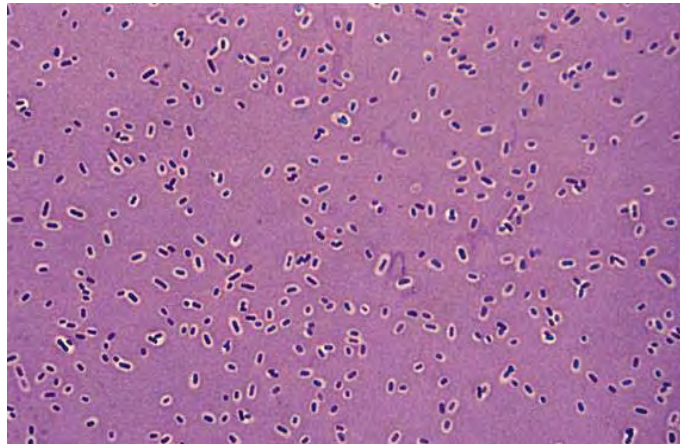


Imagen 5.- Tinción de Gram de *Klebsiella pneumoniae* vista con un microscopio de contraste de fase, visualizándose halos claros alrededor de las bacterias (organelo llamado cápsula).

Escherichia coli

Es un bacilo corto Gram negativo y flagelado como se muestra en la imagen 6, se diferencia de otros miembros de enterobacterias por su rápida fermentación de lactosa, con ácido y gas, y la clásica reacción IMViC (Indol (+), Rojo de metilo (+), Voges Proskauer (-) y Citrato de Simmons (-). Sin embargo existen algunas cepas que no fermentan la lactosa o lo hacen muy lentamente. Se presentan tanto formas móviles como inmóviles. ¹⁶

E. coli es un anaerobio facultativo y forma parte de la flora intestinal normal de los animales y humanos, fermenta la lactosa y produce rápidamente ácido y gas a partir de este azúcar. *E. coli* crece muy bien en medios de gran simplicidad (EMB, Mac Conkey, Agar Nutritivo); forma un brillo verdoso sobre el agar de eosina y azul de metileno; tiene actividad descarboxilasa de lisina; utiliza el acetato como única fuente de carbono e hidroliza el triptófano para formar indol. Forma ácido y gas de

la lactosa a 44 °C y a temperaturas inferiores, es indol positivo a 44 °C y 37 °C, RM (rojo de metilo) positivo, Voges Proskauer negativo, no crece en medios de citrato y KCN y es malonato y gluconato negativos. ¹⁷

La estructura antigénica de *E.coli* es compleja. Existen cuatro antígenos: el antígeno H (flagelar), el antígeno K (capsular), el antígeno O (somático) y el antígeno F (fimbrias/pili); de los que existen 75, 102, 167 y 12 variantes, respectivamente. ¹⁸

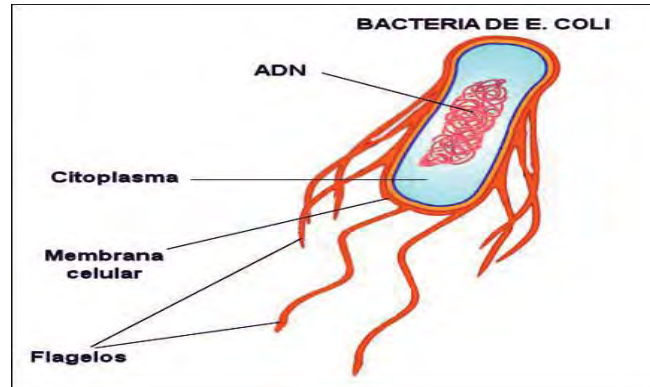


Imagen 6.- Estructuras microscópica de *Escherichia coli*.

Serratia marcescens

Serratia marcescens es un bacilo corto Gram negativo (Imagen 7), patógeno oportunista que produce neumonía, bacteremia, endocarditis, infección en vías urinarias, infección de heridas quirúrgicas y meningitis en pacientes hospitalizados, ^{13,14} siendo un importante agente de infecciones nosocomiales. Se encuentra en manos, uñas, soluciones intravenosas o en fármacos parenterales. ¹⁴



Imagen 7.- Vista microscópica de *Serratia marcescens* con un objetivo 1000x.

La bacteria es conocida por tener la habilidad de sintetizar el pigmento rojo llamado prodigiosina (2-metil-3-amilo-metoxiprodigiosina [2,3]). *S. marcescens* crece a temperaturas de entre 4 °C a 40 °C. Puede ser flagelada o no flagelada, dependiendo el medio en el que crezca. En los cultivos puede producir un olor similar al de la orina o pescado en descomposición atribuido a la producción de trimetilamina y amoniaco.

S. marcescens es capaz de prosperar en muchos entornos diferentes, debido a su producción de productos extracelulares, tales como quitinasa, ADNasa, gelatinasa, esterasa, caseinasa, lecitinasa, hemolisina, proteasa. Estas enzimas y otros compuestos permiten que la bacteria convierta la materia orgánica en metabolitos.¹⁵

Salmonella enteritidis

Salmonella enteritidis, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, Bacilo Gram Negativo, no esporulado. Este agente es ampliamente reconocido como causa de brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), especialmente a través de alimentos de origen aviar. Desde los años noventa la *Salmonella enteritidis* ha sido frecuentemente reportada como causa de brotes en países desarrollados como en vías de desarrollo. *Salmonella enteritidis*, es un patógeno entérico que provoca un cuadro de enterocolitis con diarrea, fiebre y dolor abdominal, Esta enfermedad tiene un corto período de incubación que no supera los 3 días y que generalmente se expresa en menos de 24 horas. Su duración es autolimitada, alcanzando en promedio 8 días.²²

S. enteritidis incluye más de 2,500 serotipos basados en las diferentes combinaciones de sus antígenos O, K, H este ultimo, ejemplificado en la imagen 8. La mayoría de ellos causan gastroenteritis al hombre.²³



Imagen 8.- Estructura antigénica del genero *Salmonella ssp*

Conservación de cepas bacterianas

En la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, por sus siglas en inglés) se hallan variadas técnicas disponibles para la conservación de microorganismos, por lo que debe considerarse la guía “*Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos*” publicada en 2010 apartado 7 de sus guías generales ³⁴, en la que establece que por seguridad y para minimizar la probabilidad de pérdida de las cepas, cada una debe ser mantenida por al menos dos procedimientos diferentes que brinden seguridad y reduzcan los riesgos de pérdida durante el almacenamiento.³⁰ En general, existen tres categorías en las que se agrupan los métodos de conservación dependiendo del tiempo en que permanecen viables las células conservadas, a corto, mediano y largo plazo.

Conservación a corto plazo:

La resiembra periódica es una técnica que permite la supervivencia de los cultivos en cortos períodos de tiempo, por eso se reconoce como un método de conservación a corto plazo. ^{25,29} Se basa en transferir el cultivo del medio seco a uno fresco, proporcionándole las condiciones óptimas de crecimiento, lo que condiciona el elevado riesgo de contaminación y variabilidad de las características de las cepas, las cuales constituyen sus principales desventajas. El método de resiembra en serie en tubos inclinados y en medio líquido en refrigeración tiene una duración de 15 a 20 días de almacenamiento. ³¹

Conservación a mediano plazo:

A mediano plazo, es el término que agrupa las técnicas con las que se logra mantener la viabilidad de los cultivos entre dos y cinco años. Se destacan en este grupo la desecación en diferentes soportes (arena estéril, sílica gel, perlas de vidrio, esferas de plástico o papel filtro) donde la paralización del crecimiento se produce por eliminación del agua disponible ^{24,25,26,29} así como el almacenamiento en suelo estéril, parafina líquida y la suspensión en agua estéril (destilada o de mar), métodos bien documentados en especial para los hongos. Para este tipo de conservación se utiliza un soporte sólido para atenuar el metabolismo. ³¹ Algunas técnicas utilizadas para la conservación a mediano plazo son:

- *Tierra fértil estéril*

El microorganismo se añade a el sustrato (sílica gel, arena etc.), que protegerán al microorganismo de la desecación, se coloca en un recipiente al vacío, esto es perfecto para el microorganismo que esporula (*Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*). ^{24,25}

- *Desecación en papel filtro*

Se utiliza un papel bastante absorbente (Whatmann n° 3) que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles). También es posible desecarlos por el procedimiento que se llama desecación líquida (L-Dry) porque se utiliza para ello el liofilizador, pero sin que haya habido congelación previa de las células. El vacío producido por el liofilizador deseca las células, pero hay que evitar que un vacío excesivo provoque evaporación brusca con ebullición o que la temperatura disminuya demasiado, ocasionando la congelación incontrolada de las células.

- *Desecación en bolitas de alginato.*

Éste es un procedimiento bastante eficaz. Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones

hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua. Estas bolitas de alginato se pueden conservar en tubos cerrados herméticamente y a temperaturas de entre 4 °C y 18 °C, pudiéndose guardar incluso a – 80 °C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato.

Conservación a largo plazo:

En esta categoría se ubican los métodos de congelación (a –70 °C y –196 °C) y la liofilización, como técnicas que minimizan al máximo el riesgo de cambio genético en las células y las mantienen viables por 10 años o más, ventajas que han condicionado su extensa utilización para conservar disímiles materiales biológicos (cultivos de hongos, bacterias, levaduras, algas, suero, células sanguíneas, entre otros) y que sean reconocidas como técnicas de elección.^{24,25,26,28} Son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto, así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas aun así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en sí mismo. ^{31,32} Algunas de las técnicas de conservación a largo plazo son:

- Mantenimiento de cultivos por congelamiento

En muchas ocasiones es más conveniente mantener un cultivo usando técnicas menos convencionales, de tal forma que una de las empleadas es por congelamiento del cultivo, este método tiene el inconveniente de que la velocidad de muerte del microorganismo será mayor cuando menos baja sea la temperatura de mantenimiento, además también durante el proceso de congelamiento algunas células mueren. En la conservación de cultivos por este procedimiento, se requiere equipo capaz de mantener temperaturas de enfriamiento bastante bajas, esto puede lograrse con el uso de nitrógeno líquido. ^{29, 31,32}

- Mantenimiento de cultivos por liofilización ó Freeze - Drying

Es un método de conservación a largo plazo y se basa en la paralización del metabolismo celular por falta de agua: congelación y sublimación. Con ello la

estabilidad genética es alta, pero a veces no tanto como en la congelación, porque la liofilización se consigue por sublimación del hielo de las células. Por lo tanto, primero tenemos que congelar el agua libre de las células y después eliminarla mediante el vacío, sin que haya necesidad de subir la temperatura, lo que acabaría afectando la viabilidad del microorganismo. Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores.

La liofilización es apropiada para la conservación de la mayoría de las bacterias, encontrándose que las Gram positivas sobreviven mejor que las Gram negativas cuando se liofilizan y mantiene en condiciones similares. También se emplea en la conservación de esporas, actinomycetos, muchos hongos y levaduras.^{26,28,31}

Crioconservación

La crioconservación consiste en la conservación de los microorganismos a temperaturas inferiores a cero grados centígrados en suspensión en un líquido y con un agente crioprotector. Se basa en la paralización del metabolismo celular por la disminución del agua disponible.^{29, 31,32}

Este tipo de conservación es utilizada en la práctica común, para trabajo continuo, ya que mantiene un ritmo elevado de metabolismo. No se recomienda utilizar este tipo de conservación para trabajos de periodos largos ya que provoca mucho estrés al microorganismo y la reactivación es muy rápida.^{25, 26,31}

Los cuatro factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes:

1. Edad de las células: En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado. Esto sucede en el caso de microorganismos que esporulan, en algunos pleomórficos e incluso en algunos más sencillos.

2. Velocidad en la congelación y descongelación: Aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37 °C.

3. Temperatura de almacenamiento: Debe ser lo más baja posible. Lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195 °C, o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140 °C. En el mercado existen variados tipos de armarios congeladores, de los cuales los más aconsejables son los que alcanzan temperaturas por debajo de -70 °C. Aquellos que sólo alcanzan temperaturas entre -20 °C y -40 °C, como ocurre con la mayoría, no son aconsejables, entre otras cosas porque debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja. El daño que se produce en las células es debido a que a estas temperaturas hay frecuentes congelaciones y descongelaciones. Si se añade un crioprotector no iónico, como por ejemplo glicerol, se reduce la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica.

Para la conservación en armarios congeladores, las células se almacenan en criotubos (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación que cierran herméticamente), preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión. De esta manera se evita que las cepas se congelen y se descongelen varias veces. Esto también se puede evitar empleando tubos con criobolas (bolas de tipo abalorio que se impregnan con la solución celular a congelar), ya que para tomar una muestra basta con emplear una o varias bolitas sin necesidad de descongelar el resto. Este método no se debe emplear para la conservación de microorganismos anaerobios, ya que al estar las células en una superficie hay mayor contacto con el oxígeno y puede afectarse la viabilidad.

4. Empleo de agentes crioprotectores: Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%. También se pueden utilizar el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar.^{31,33}

Escala Nefelométrica de Mc Farland

La escala nefelométrica de turbidez Mc Farland es usada para determinar la intensidad de proliferación de bacterias en medios de cultivo, esta multiplicación en medios líquidos se manifiesta por un aumento de partículas (bacterias) que se oponen al libre paso de la luz o la opacidad en el centro. Cuando mayor sea el número de bacterias, mayor será la opacidad del medio. La finalidad es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana y por espectrofotometría se crea una recta patrón, de forma que se pueda detectar la concentración de las diluciones bacterianas (de manera aproximada, ya que depende de factores como el tamaño de la bacteria y la formación de agregados). Se trata de una serie numerada de 10 tubos. La escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico con diferentes cantidades de cloruro de bario al 1% y ácido sulfúrico al 1%, para obtener diferentes concentraciones de sulfato de bario, que corresponden a diferentes recuentos bacterianos., la tabla 1 nos muestra la concentración de UFC/mL para cada tubo de Mc Farland, así como las concentraciones de cloruro de bario y ácido sulfúrico que se tiene que utilizar para la preparación de los 10 tubos de la escala nefelométrica.

42

Cuadro 1. Equivalencia de UFC/mL para cada tubo de Mc Farland y proporciones de H₂SO₄ y BaCl₂ que se utilizan para preparar cada tubo de la escala.

Escala de Mc Farland			
TUBO	BaCl₂ 1%(mL)	H₂SO₄ 1%(mL)	U.F.C/mL
0.5	0.05	9.95	1.5x10 ⁸
1	0.1	9.9	3.0x10 ⁸
2	0.2	9.8	6.0x10 ⁸
3	0.3	9.7	9.0x10 ⁸
4	0.4	9.6	1.2x10 ⁹
5	0.5	9.5	1.5x10 ⁹
6	0.6	9.4	1.8x10 ⁹
7	0.7	9.3	2.1x10 ⁹
8	0.8	9.2	2.4x10 ⁹
9	0.9	9.1	2.7x10 ⁹
10	1.0	9.0	3.0x10 ⁹

Para la preparación de los once tubos de la escala de Mc Farland, primeramente tenemos que preparar las soluciones al 1% de cloruro de bario y ácido sulfúrico, posteriormente usamos una micropipetas de 100 µL y una pipeta de 10mL para verter las cantidades establecidas en el cuadro 1 para BaCl₂ y H₂SO₄ respectivamente.

Fundamentos de las Pruebas Bioquímicas

Prueba Agar ChromID CPS

Medio cromogénico utilizado en el aislamiento e identificación directa de *E. coli*, *Proteus* y *Enterococcus* en muestras urinarias, aislamiento y recuento de todos los patógenos del tracto urinario, buen aislamiento y fácil identificación de las colonias diferentes gamas cromáticas de color dependiendo la cepa inoculada como se aprecia en la imagen 9.

Características e identificación de microorganismos en el medio CPS

- *E. coli*: β -glucuronidasa (β - GUR). No requiere prueba del indol. Colonias con coloración burdeos.
- La sensibilidad de la detección y la especificidad de la coloración para los principales organismos habitualmente encontrados en orina.
- Identificación del grupo de bacterias KESC (*klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*). KESC: mejor intensidad de la coloración verde a azul palido, debido al aumento de la actividad β -glucosidasa.
- Orientación en la identificación de *Streptococcus agalactiae*.³

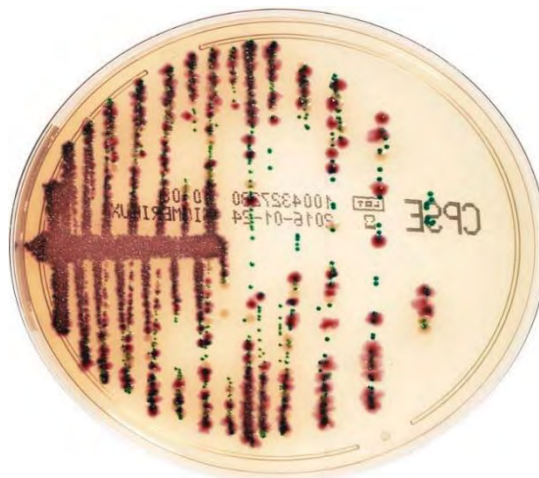


Imagen 9.- Agar CPS inoculado con *Escherichia coli* (rojo-cobrizo), *Proteus mirabilis* (café) y *Enterococcus faecalis* (verde).

Prueba ChromID *Salmonella* Elite

El medio chromID *Salmonella* Elite está constituido por una base nutritiva que asocia diferentes peptonas y substratos cromogénicos (patente depositada) que permite:

- El crecimiento del conjunto *Salmonella*
- El revelado de las actividades enzimáticas correspondientes

La mezcla selectiva permite inhibir las bacterias Gram (+), algunas bacterias Gram (-), las levaduras y los mohos. La diferenciación del género *Salmonella*, comprendidas las *Salmonella* lactosa (+), descansa en la aparición espontánea de un color malva pálido a malva de las colonias productoras de C8—esterasa, características expresadas por la mayoría de las *Salmonellas* como se observa en la imagen 10. ³⁶



Imagen 10.- Agar *Salmonella* Elite con inóculo de *Salmonella typhimurium*.

Prueba Agar Salmonella-Shigella

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial. La selectividad, está dada por las sales biliares y el verde brillante, que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasor del *Proteus spp.* Es diferencial debido a la fermentación de la lactosa, y a la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio. Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo. *Salmonella*, *Shigella* y otros microorganismos no fermentadores de lactosa, crecen bien en el medio de cultivo, y producen colonias transparentes. La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro

como se muestra en la imagen 11 donde *Salmonella typhimurium* presenta ennegrecimiento en las colonias. ⁴⁷

Cuadro 2. Colonias que se presenta con respecto a la cepa inoculada en el medio S-S

Microorganismos	Tipo de Colonia
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Rosadas a rojas
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Rosadas cremosas y mucosas
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	Transparentes, centro negro



Imagen 11.- Agar Salmonella-Shigella con inculo de *Salmonella typhimurium*.

Prueba Agar Eosine Methylene Blue (EMB)

Este medio combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas. Muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter spp* presentan un característico brillo metálico, como se ejemplifica en la imagen 12. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras.

Otras bacterias oxidativas pueden dar colonias de color azul lavanda; esto puede ocurrir aunque las cepas no sean capaces de acidificar a partir de lactosa al 0.5% y ello se debe a la incorporación de azul de metileno a sus membranas. En este medio se obtiene además, un buen desarrollo del genero *Klebsiella spp* con aparición de colonias rosa púrpura como se menciona en el cuadro 3.³⁷

Cuadro 3. Colonias presentes en medio EMB dependiendo la cepa inoculada

Microorganismos	Tipo de Colonia
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Verde con brillo metálico y centro negro azulado
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Mucosas, rosa púrpura, confluentes

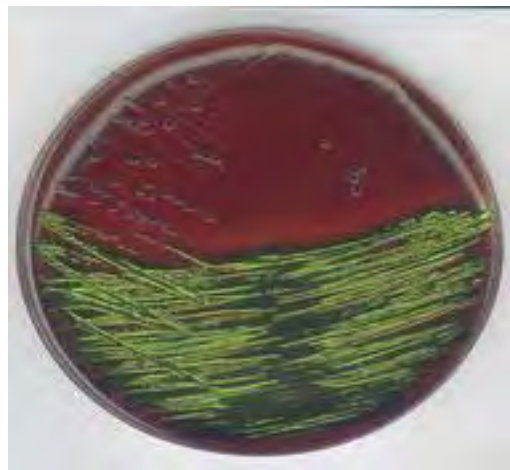


Imagen 12.- Agar EMB con inóculo de *Escherichia coli*.

Prueba Agar Brain Heart Infusion (BHI)

Es un medio muy rico en nutrientes, que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno, y vitaminas. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad amortiguadora. El agar es el agente solidificante.

El agar cerebro corazón mantiene los mismos principios que el caldo para el cultivo de estreptococos y otras bacterias exigentes. Con el agregado de 10% de sangre de caballo desfibrinada, fue utilizado para el crecimiento de *Histoplasma capsulatum*

Ivy de hongos patógenos. Por tratarse de un medio que contiene glucosa, no es un agar sangre apropiado para la observación de reacciones de hemólisis.

En este medio particularmente *S. marcescens* presenta colonias de color rojo, esta coloración se presenta debido a que *S. marcescens* al estar en su fase de crecimiento exponencial, genera un pigmento llamado Prodigiosina (imagen 13).^{38,5}



Imagen 13.- Agar B.H.I. con inóculo de *Serratia marcescens* produciéndose un pigmento rojo llamado prodigiosina.

Prueba Citrato de Simmons

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino y a verde en medio ácido como se aprecia en la imagen 14. El medio de cultivo es diferencial con base en que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad.

El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio

alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa, los miembros de la familia Enterobacteriaceae son ampliamente identificados con esta prueba como se muestra en el cuadro 4.^{39,42}

Cuadro 4. Cambios en el medio Citrato de Simmons dependiendo la cepa inoculada

Microorganismos	Citrato permeasa	Color del medio
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Negativo	Verde
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Positivo	Azul



Imagen 14.- Prueba de Citrato de Simmons negativa (Izquierda) y positiva

Prueba Motility-Indole-Ornithine (MIO)

Medio de cultivo semisólido, altamente nutritivo debido a la presencia de extracto de levadura, peptona y tripteína. Además, la tripteína aporta grandes cantidades de triptofano, sustrato de la enzima triptofanasa, para la realización de la prueba del indol. La dextrosa es el hidrato de carbono fermentable, la ornitina es el sustrato para la detección de la enzima ornitina decarboxilasa, el púrpura de bromocresol es el indicador de pH, que en medio alcalino es de color púrpura y en medio ácido es amarillo.

Por su composición, es posible detectar 3 reacciones en un mismo tubo: movilidad, presencia de ornitina decarboxilasa e indol. La movilidad se demuestra por un enturbiamiento del medio o por crecimiento que difunde más allá de la línea de inoculación. La reacción positiva a la ornitina está dada por un color púrpura del

medio. Debido a la fermentación de la glucosa se reduce el pH produciendo una condición ácida y originando que el indicador de pH púrpura de bromocresol vire al amarillo. La presencia de acidez, otorga condiciones óptimas para la actividad de la enzima ornitina decarboxilasa, la cual decarboxila la ornitina presente. Por decarboxilación, se alcaliniza el medio, con el consecuente viraje del indicador hacia el color púrpura.

El indol, es producido a partir del triptófano por los microorganismos que contienen la enzima triptofanasa como se muestra en la reacción ejemplificada en la imagen 15. El desarrollo de un color rojo luego de agregar unas gotas de reactivo de Kovac's o de Erlich, indica un resultado positivo.^{40,42}

Cuadro 5. Reacciones en el medio MIO dependiendo la cepa inoculada

Microorganismos	Movilidad	Indol	Ornitina decarboxilasa
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	+	-	+

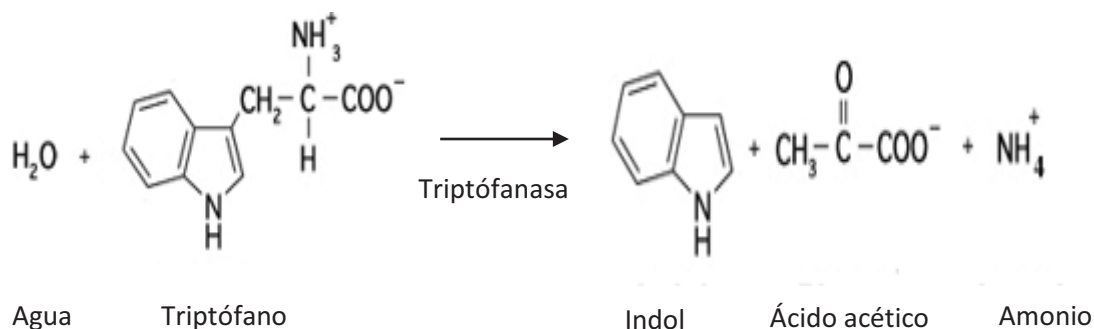


Imagen 15.- Reacción de producción de Indol a partir de triptófano, catalizada por la enzima triptófanasas

Prueba Lysine-Iron-Agar (LIA)

En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas decarboxilasa y deaminasa. El citrato de hierro y amonio, y el tiosulfato de sodio,

son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El purpura de bromocresol, es el indicador de pH, el cual es de color amarillo a pH igual o menor a 5.2, y de color violeta a pH igual o mayor a 6.8. Por decarboxilación de la lisina, se produce la amina cadaverina, que alcaliniza el medio y esto produce el viraje del indicador al color violeta. La decarboxilación de la lisina, tiene lugar en medio ácido, por lo que es necesario que la glucosa sea previamente fermentada.

Los microorganismos que no producen lisina decarboxilasa, pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al amarillo, pero a las 24 horas de incubación se observa el pico de color violeta debido al consumo de las peptonas, y el fondo amarillo. La producción de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro. Las cepas de los géneros *Proteus*, *Providencia* y algunas cepas de *Morganella*, desaminan la lisina, esto produce un ácido alfa-ceto-carbónico, el cual, con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno forma un color rojizo en la superficie del medio, los cambios en el medio LIA dependiendo el género bacteriano inoculado se aprecian en la imagen 16. ⁴¹

Cuadro 6. Cambios en el medio LIA dependiendo la cepa inoculada

Microorganismos	Pico de flauta	Fondo del tubo	H ₂ S (medio negro)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Púrpura	Púrpura	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Púrpura	Púrpura	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	Púrpura	Púrpura	+



Imagen 16.- Resultados LIA 1) Descarboxilación de lisina (-), 2) Descarboxilación de lisina (+) 3) Descarboxilación de lisina (+) con producción de H₂S.

Prueba Kligler-Iron-Agar (KIA)

En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripectona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{+3} los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro, estos diferentes cambios en el medio KIA al ser inoculadas diferentes cepas se pueden observar en la imagen 17.^{42, 45}

Cuadro 7. Cambios en el medio KIA dependiendo la cepa inoculada

Microorganismo	Pico de flauta/Fondo	Producción de gas	H ₂ S (medio negro)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	A/A	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	A/A	+	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	K/A	+	+

K: Alcalino A: Ácido



Imagen 17.- Prueba de Kligler-Hierro-Agar con diferentes bacterias inoculadas.

Prueba Methyl Red / Voges-Proskauer (MR-VP)

En el medio de cultivo, la pluripeptona aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y la glucosa es el hidrato de carbono fermentable. La glucosa puede ser metabolizada por los microorganismos, a través de distintas vías metabólicas. Según la vía utilizada, se originarán productos finales ácidos (ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico), o productos finales neutros (acetil metil carbinol). Esta diferencia en el metabolismo bacteriano, podría ser reconocida por la adición de un indicador como rojo de metilo, para revelar la presencia de productos ácidos con la aparición de un color rojizo en el medio(imagen 18), y por la adición de alfa naftol e hidróxido de potasio para evidenciar la presencia de productos finales neutros.

Voges y Proskauer, describieron una coloración rojiza opaca que aparecía después de adicionar hidróxido de potasio a los cultivos de ciertos microorganismos en medio con glucosa (imagen 19). Esta coloración se debe a la oxidación del acetilmetil carbinol a diacetilo el cual reacciona con la peptona del medio para dar un color rojo opaco.^{42,43}

Cuadro 8. Resultados de la prueba RM-VP con diferentes cepas inoculada

Microorganismo	Crecimiento	MR	VP
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bueno	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Bueno	-	V-

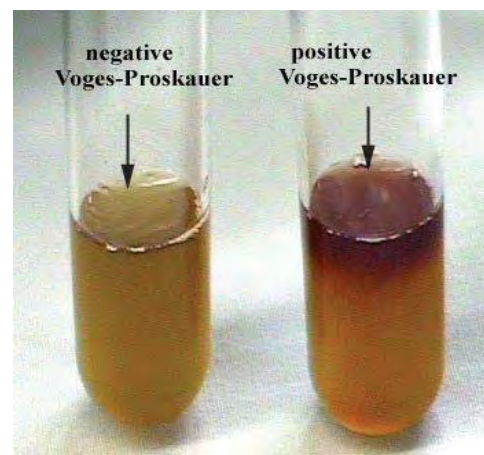
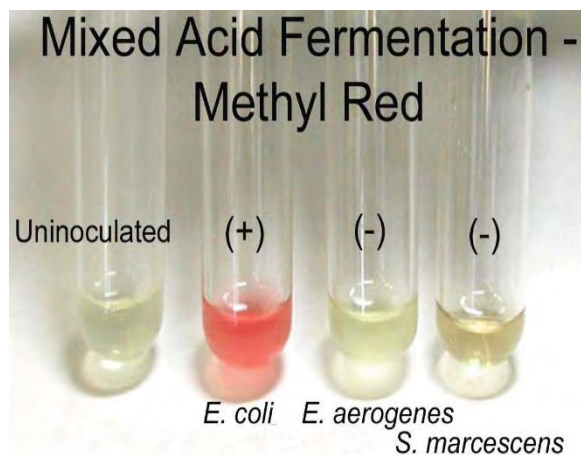


Imagen18 y 19.- Prueba de Rojo de metilo (Izquierda) y Voges-Proskauer (Derecha).

Recuento microbiano por vertido en placa

La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable se debe de tomar una alícuota o una muestra de volumen o peso conocido, y vestirla en una caja Petri estéril, posteriormente agregar el agar básico, selectivo o enriquecido previamente esterilizado a la caja Petri, verificar que el agar se encuentre a temperatura no mayor a 45 °C, con el fin de no dañar a los microorganismos con temperaturas muy altas, debido que a nosotros nos interesa el recuento de microorganismos viables, finalmente se procede a homogenizar la muestra con el agar haciendo movimientos curvilíneos en forma de ocho, dejar que se solidifique, incubar a 37 °C durante 24 horas y posteriormente leer el número de UFC, el procedimiento antes mencionado se esquematiza en la imagen 20. ⁴⁴

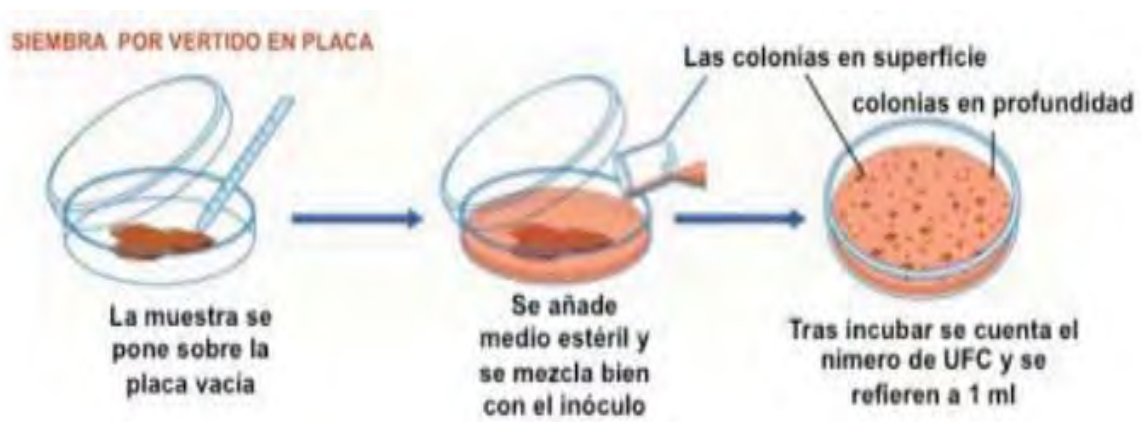


Imagen 20.- Técnica de vertido en placa para recuento colonial.

PLANETAMIENTO DEL PROBLEMA

La crioconservación de cepas bacterianas, ha sido una forma efectiva y de gran ayuda para las industrias y laboratorios clínicos, para mantener sus cepas de referencia por largos lapsos de tiempo; algunos de los usos principales de estas cepas es para control de calidad microbiano, en producción industrial de productos biotecnológicos así como para mantener líneas bacterianas específicas modificadas genéticamente para fines médicos o industriales.

En el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la U.M.I.E.Z de la F.E.S. Zaragoza se adaptó un micrométodo de crioconservación para las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens*, este micrométodo al no ser adaptado antes a estas Enterobacteria, es imprescindible realizar controles de calidad con el fin de garantizar la viabilidad de las cepas, su pureza y sus características bioquímicas que las hacen útiles para fines clínicos e industriales.

OBJETIVO GENERAL

Adaptar el micrométodo de crioconservación Zaragoza así como realizar los controles de calidad a las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adaptar el micrométodo de crioconservación Zaragoza a las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.
- Realizar las técnicas de control de calidad para las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* preservadas por el micrométodo de crioconservación Zaragoza.

- Determinar la viabilidad de las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* preservadas por el micrométodo de crioconservación Zaragoza, de manera mensual por un lapso de seis meses.

HIPÓTESIS

Después de llevar acabo de manera mensual por un lapso de seis meses las pruebas bioquímicas, el recuento en placa y el análisis macroscópica así como el microscópico de las cepas en estudios, se corroborará que la carga microbiana, viabilidad y las características bioquímicas de las 4 cepas de la familia Enterobacteriaceae, son mantenidas adecuadamente mediante el micrométodo de crioconservación Zaragoza.

DISEÑO EXPERIMENTAL

- Tipo de estudio: Experimental y Prospectivo
- Población de estudio: Cepas bacterianas de la Familia *Enterobacteriaceae*
- Criterios de inclusión: Cepas bacterianas de la Familia *Enterobacteriaceae* *correctamente identificadas*
- Criterios de exclusión: Cepas contaminadas por algún microorganismo.

VARIABLES

- Dependiente: Cepas bacterianas de la Familia *Enterobacteriaceae*
- Independiente: Tiempo de conservación, temperatura de almacenamiento y líquido crioprotector.

MATERIAL

- Mechero Fisher
- Tubos de ensaye de 13x100 con tapa de rosca
- Tubos de ensaye de 16x150 con tapa de rosca
- Gradilla
- Cajas Petri
- Asa bacteriológica

- Lápiz punta diamante
- Algodón
- Gasa
- Papel Kraft
- Tubos capilares microhematocrito sencillos s/ heparina CORNING
- Pinzas de disección
- Jeringa estéril 10 mL
- Micropipeta de 5-50 μ L BioHit Proline
- Micropipeta de 10-100 μ L BioHit Proline
- Micropipeta de 100-1000 μ L BioHit Proline
- Pipeta Powerpette JENCONS
- Puntas para micropipeta BioClean
- Criotubos estériles con radiación Gamma Eppendorff
- Marcador indeleble
- Matraz Erlenmeyer 500 mL
- Matraz bola 25 mL
- Celdas estériles para espectrofotómetro Milton Roy
- Probeta de 100 mL
- Cinta Adhesiva Maskin Tape
- Vaso de precipitados de 250 mL
- Portaobjetos

EQUIPO

- Autoclave
- Incubadora 37 °C \pm 2 °C . SHEL LAB
- Microscopio electrónico PRIMO STAR ZEISS
- Balanza Digital Explorer PRO
- Congelador -20 °C Tor Rey
- Espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC SPECTRONIC 20+

MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo B.H.I. BD Bioxon
- Caldo Soya-Trypticaseina DIBICO
- Caldo Rojo de Fenol MERCK
- Agar-Agar DIBICO
- Agar Soya-Trypticaseina BD Bioxon

- Agar Citrato de Simmons DIBICO
- Agar MIO DIBICO
- Agar LIA BD Bioxon
- Agar KIA DIFCO
- Agar EMB BD Bioxon
- Agar S-S BioMérieux
- Agar ChromID Salmonella Elite BioMérieux
- Agar **ChromID** CPS BioMérieux

REACTIVOS

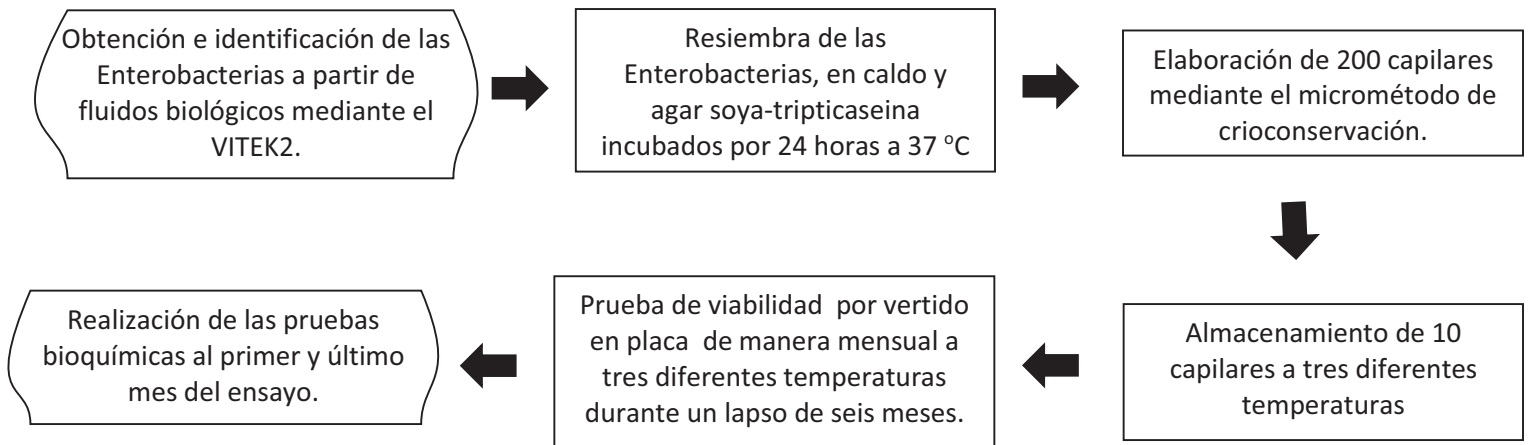
- Aceite de Inmersión HYCEL
- Agua Destilada
- Solución Salina inyectable 0.9% PiSA
- Colorantes de Gram (Cristal Violeta y Safranina) SIGMA
- Lugol SIGMA
- Solución Alcohol-Yodo SIGMA
- Hipoclorito de sodio GREAT VALUE
- Leche descremada SVELTY
- Sacarosa, Lactosa y Glucosa SIGMA
- Reactivo de Kovac (alcohol isoamilo, p-dimetilaminobenzaldehído y HCl concentrado).
- Hidróxido de Potasio (KOH) 40%
- α -Naftol 5%

CEPAS

- *Escherichia coli**
- *Klebsiella pneumoniae**
- *Serratia marcescens**
- *Salmonella enteritidis**

*Nota: Las cepas antes mencionadas fueron obtenidas de fluidos biológicos e identificados en el equipo automatizado VITEK2 en la clínica No. 47 del IMSS con ayuda del Q.F.B. Armando Ramírez González.

DIAGRAMA DE FLUJO



MÉTODOS

Identificación inicial de las 4 cepas de Enterobacterias mediante el VITEK2

Las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Salmonella enteritidis* fueron identificadas mediante un equipo automatizado de identificación bacteriana llamado VITEK2 (Imagen 21) el cual tiene un amplio margen de confiabilidad, estas cepas fueron aisladas de diferentes fluidos biológicos en el laboratorio de Microbiología de la Clínica No. 47 “Vicente Guerrero” del Instituto Mexicano del Seguro Social con ayuda del Q.F.B Armando Ramírez González.



Imagen 21 - Equipo Automatizado de identificación Bacteriana VITEK2

Reconstitución de las 4 cepas de Enterobacterias

1. Realizar una siembra mediante un asa bacteriológica estéril de las 4 cepas en caldo Soya-Trypticaseina, Incubar a 37 °C por 24 horas.
2. Pasadas las 24 horas de incubación realizar la técnica de tinción de Gram para posteriormente observarlas al microscopio a objetivo 100x.
3. Realizar resiembra a partir de los caldos Soya-Trypticaseina previamente incubados con las 4 cepas, en tubo inclinado de agar Soya-Trypticaseina por estría cruzada.

Micrométodo de crioconservación Zaragoza

I. Ajuste de la carga de Microorganismos mediante el Nefelómetro de Mc Farland. Para cada bacteria:

1. Medir 3 mL de Solución salina inyectable estéril (0.9% Laboratorio PISA) con una jeringa estéril y pasarlos al tubo inclinado de Agar Soya-Trypticaseina inoculado con cada una de las cepas de estudio y agitar hasta obtener una suspensión turbia.
2. Pasar esta suspensión a una celda estéril para espectrofotómetro y comparar visualmente con el tubo 8 de Mc Farland (2.4×10^9 UFC/mL), en caso de estar más turbia la suspensión resultante, agregar solución salina inyectable estéril (0.9% Laboratorio PISA) suficiente para obtener una turbidez igual al tubo 8 del nefelómetro. Posteriormente realizar un segundo ajuste en el espectrofotómetro entre 3 y 7 de transmitancia; y una vez ajustada la solución pasarla a un tubo de ensaye 13 x 1 00 con tapón de rosca estéril.

II. Estandarización de la carga bacteriana en el tubo capilar.

1. Marcar con tinta indeleble cada tubo capilar en tres partes iguales, llenar el tubo capilar a una tercera parte con agua común y sellar a la flama por ambos extremos, volver a pesar cada uno de los tubos nuevamente en la balanza y obtener una media del peso de los tubos capilares llenos a su tercera parte.

Este paso servirá para saber aproximadamente el valor en μL de la carga bacteriana por tubo capilar.

III. Ajuste de la concentración y esterilización de leche descremada Svelty mediante calor húmedo a presión.

1. Preparar 5 mL de leche descremada al 20%. Pesando 1.5 g de leche descremada Svelty en polvo respectivamente en un matraz Erlenmeyer y diluir en 5 mL de Agua destilada.
2. Tapar el matraz Erlenmeyer con una torunda de algodón y esterilizarlo por calor húmedo a 121 °C 15lb de presión por 10 minutos en autoclave sin que se desnaturalice la leche.

IV. Prueba como crioprotector de la leche descremada de concentración elegida.

1. Tomar una muestra de 0.5 mL de la solución ajustada del paso I con una Micropipetas y depositarla en un criotubo estéril de 2 mL con tapón de rosca que contengan 1.5 mL de leche descremada estéril, tapar, agitar y rotular. Almacenar hasta su uso.
2. Llenar a una tercera parte 200 tubos capilares estériles cerca del mechero en una zona limpia con la suspensión del paso anterior, sellar a la flama el tubo capilar por ambos extremos. Este procedimiento se realizara para cada una de las cuatro cepas de Enterobacterias.
3. Colocar los 200 tubos en tubos Eppendorff con tapa de rosca de 50 mL para posteriormente almacenarlos en el congelador.

Prueba de conservación a diferentes temperaturas

1. Conservar los tubos capilares de cada bacteria a tres diferentes temperaturas como se especifica en el siguiente cuadro:

Cuadro 9. Almacenamiento de las cepas crioconservadas a diferentes temperaturas

Bacteria	Crioprotector	Temperatura	No. de tubos capilares
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Leche descremada	Temp. ambiente	10
	Leche descremada	4 °C	10
	Leche descremada	-24 °C	10
<i>Serratia marcescens</i>	Leche descremada	Temp. ambiente	10
	Leche descremada	4 °C	10
	Leche descremada	-24 °C	10
<i>Escherichia coli</i>	Leche descremada	Temp. ambiente	10
	Leche descremada	4 °C	10
	Leche descremada	-20 °C	10
<i>Salmonella enteritidis</i>	Leche descremada	Temp. ambiente	10
	Leche descremada	4 °C	10
	Leche descremada	-20 °C	10

Prueba de viabilidad mensual por un lapso de seis meses

1. Limpiar los extremos del tubo capilar con una torunda impregnada con solución alcohol-yodo.
2. Marcar los extremos del tubo capilar con un lápiz punta diamante y romper por los extremos del tubo con unas pinzas, inocular su contenido en 5 mL de Caldo Soya-Trypticaseina estéril, tapar, agitar e incubar a 37 °C por 24 horas.
3. Posterior a las 24 horas de incubación tomar una alícuota de 44 µL del caldo Soya-Trypticaseina del paso anterior y con una Micropipeta de 5-50 µL BioHit Proline, e inocular una caja Petri estéril.
4. Agregar 15 mL de Agar Soya-Trypticaseina estéril a 45 °C en la misma caja Petri y homogenizar con movimientos en forma de ocho. Dejar solidificar e incubar a 37 °C por 24 horas
5. A cada uno de los cultivos, realizar conteo colonial posterior a las 24 horas de incubación.

Nota: Realizar este procedimiento mensualmente durante un lapso de tiempo de seis meses, para cada una de las bacterias en estudio. ⁴⁶

Tinción de Gram

1. Se toma una pequeña porción de inóculo con un asa de platino previamente esterilizada y se coloca en un portaobjetos.

2. Se deja secar y posteriormente se fija la preparación a la flama, hasta que el inóculo se seque por completo.
3. Agregar unas gotas de cristal violeta, dejar por 1 minuto y enjuagar con agua corriente.
4. Agregar unas gotas de Lugol, dejar por 1 minuto y enjuagar con agua corriente.
5. Agregar unas gotas de solución Alcohol-Acetona hasta eliminar el excedente de colorante y lavar la laminilla con agua corriente.
6. Agregar safranina por 30 segundos y lavar la laminilla con agua corriente.
7. Visualizar al microscopio en objetivo 100x utilizando aceite de inmersión. ¹⁸

Pruebas Bioquímicas

Prueba Agar ChromID CPS

1. Para la identificación de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Serratia* a partir del cultivo, tomar con asa bacteriológica una muestra del crecimiento colonial en caldo Soya-Trypticaseina de *Klebsiella pneumoniae* y sembrar en CPS Chromagar, mediante estría por agotamiento.

Interpretación:

- *Klebsiella* y *Serratia*, dan coloración verde/azul a pardo-verdosa de las colonias productoras de β -glucosidasa.
- *Escherichia coli*, coloración rosa a burdeos de las colonias productoras de β -glucuronidasa. ³⁵

Prueba Agar Salmonella-Shigella

1. Para la identificación de *Salmonella enteritidis* a partir del cultivo, tomar con asa bacteriológica una muestra del crecimiento colonial en caldo Soya-Trypticaseina de *Salmonella enteritidis* y sembrar en Agar Salmonella-Shigella en estría por agotamiento.

Interpretación: *Salmonella enteritidis* presenta la aparición de colonias incoloras debido a la no fermentación de la lactosa con sus centro color negro, característico de las cepas productoras de ácido sulfhídrico. ⁴⁷

Prueba Agar Eosin Methylene blue (EMB)

1. Suspender 36 g del polvo en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos; mezclar, calentando a ebullición hasta su disolución. Esterilizar en autoclave a no más de 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos.
2. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles
3. Para la identificación de *Escherichia coli* a partir del cultivo, tomar con asa bacteriológica una muestra del crecimiento colonial en caldo Soya-Trypticaseina de *E. coli* y sembrar en estría por agotamiento.
4. Incubar las placas a 37 °C durante 24 horas y examinar el desarrollo colonial.

Interpretación: *E. coli* presenta en sus colonias coloración purpura oscuras con contorno verde metálico muy característicos por el vire del indicador a verde brillante.³⁷

Prueba Agar ChromID Salmonella Elite

1. Para la identificación de *Salmonella enteritidis* a partir del cultivo, tomar con asa bacteriológica una muestra del crecimiento colonial en caldo Soya-Trypticaseina de *Salmonella enteritidis* y sembrar en ChromID Salmonella Elite en estría por agotamiento.

Interpretación: *Salmonella enteritidis* presenta la aparición espontanea de un color malva pálido a malva de las colonias productoras de C8-esterasa.³⁶

Prueba Agar Brain Heart Infusion (B.H.I.)

1. Disolver 52 g de polvo en un litro de agua destilada. , posteriormente agregar 3 g de Agar-Agar, calentar a ebullición hasta su disolución total. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C (15 libras de presión).
2. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles.
3. Para la identificación de *Serratia marcescens* a partir del cultivo, tomar con asa bacteriológica una muestra del crecimiento colonial en caldo Soya-Trypticaseina de *S. marcescens* y sembrar en estría por agotamiento.

4. Incubar las placas a 37 °C durante 24 horas y examinar el desarrollo colonial.

Interpretación: *S. marcescens* presenta en sus colonias coloración rojo intenso, en algunos es opaco. ³⁸

Prueba de Fermentación de Hidratos de Carbono

1. Suspender 1.5 g del medio Caldo Rojo de Fenol (CRF) en 100 mL de agua destilada y disolver en el caldo 0.5 g del hidrato de carbono que se evaluara.
2. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución.
3. Dispensar en tubos de ensaye (con campana de Durham si se requiere), tapar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
4. Inocular el CRF con una gota de la suspensión bacteriana.
5. Incubar a 37 °C durante 24 horas.
6. Examinar los tubos para evaluar crecimiento, producción de ácido y producción de gas.

Interpretación: La presencia de un color amarillo en el tubo indica una reacción positiva para la fermentación del hidrato de carbono. La presencia de una o más burbujas en la campana de Durham indica una reacción positiva para la producción de gas. ⁴²

Prueba de Motility- Indol- Ornithine (MIO)

1. A partir de un cultivo, sembrar por punción profunda con aguja de inoculación recta. Se debe inocular el centro del tubo, y la punción debe abarcar dos tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie. Es importante que la siembra se realice en línea recta.
2. Incubar durante 24 horas. a 37 °C.
3. Agregar 3-5 gotas de reactivo de Kovac o de reactivo de Erlich.

Interpretación:

- Cepas móviles: Producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra.
- Cepas inmóviles: El crecimiento se observa solamente en la línea de siembra.

- Cepas Ornitina descarboxilasa positivas: color púrpura.
- Cepas Ornitina descarboxilasa negativas: color amarillo. A veces se puede desarrollar un color violáceo en la superficie del medio.
- Cepas indol positivas: Desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovac.
- Cepas indol negativas: Sin cambio de color. ^{40,42}

Prueba de Klieger-Iron-Agar (KIA)

1. Pesar con precisión la cantidad que se indica en la etiqueta.
2. Rehidratar con agua destilada o desionizada.
3. Calentar suavemente la solución.
4. Distribuir aproximadamente 5 mL por tubo.
5. Esterilizar a 121 °C, 15 lb, 15 min.
6. Enfriar en una posición inclinada
7. Inocular por estría cruzada en el pico de flauta y punción con asa recta al fondo del tubo, los microorganismos en estudio en tubos diferentes, correctamente etiquetados cada uno.
8. Incubar A 35 °C por 18-24 horas.

Interpretación:

1. Utilización de hidratos de carbono
 - La fermentación de solamente la glucosa
 - a) Pico de flauta: Reacción Alcalina, Color Rojo.
 - b) Fondo: Reacción Ácida, Color Amarillo.
 - Fermentación de la glucosa y la lactosa
 - a) Pico de flauta: Reacción Ácida, Color Amarillo.
 - b) Fondo: Reacción Ácida, Color Amarillo.
 - No hay fermentación ni de la glucosa ni de la lactosa
 - a) Pico de flauta: Ningún cambio en el color rojo original del medio.
 - b) Fondo: Ningún cambio en el color rojo original del medio.
2. Producción de gas (CO₂ y H₂)
 - Evidente por alguna de las siguientes razones:

- a) Una sola burbuja de gas.
- b) Burbujas en el medio.
- c) Fragmentación del medio.
- d) Desplazamiento completo del medio desde el fondo del tubo.
- e) Desprendimiento ligero del medio de la pared del tubo. ⁴²

3. Producción de H₂S(Precipitado negro de sulfuro ferroso)

- Evidente por alguna de las siguientes razones:
 - a) Diseminación del color negro en todo el fondo, lo cual enmascara la acidez, puede haber leve evidencia en el pico de flauta.
 - b) Un anillo negro cerca de la parte superior del fondo.
 - c) Un precipitado negro esparcido en el fondo, pero sin enmascarar completamente la acidez. ^{42,45}

Prueba de Lysin-Iron-Agar (LIA)

1. Pesar con precisión la cantidad que se indica en la etiqueta.
2. Rehidratar con agua destilada o desionizada.
3. Calentar suavemente la solución.
4. Distribuir aproximadamente 5 mL por tubo con tapa de rosca.
5. Esterilizar a 121 °C, 15 lb, 15 min.
6. Enfriar en una posición inclinada.
7. Inocular por estría cruzada en el pico de flauta y punción con asa recta al fondo del tubo, los microorganismos en estudio en tubos diferentes, correctamente etiquetados cada uno.
8. Incubar A 35 °C por 18-24 horas. Puede requerir una incubación prolongada (hasta 4 días).

Interpretación:

- a) Positivo: pico de flauta púrpura/extremo inferior púrpura, con H₂S o sin él.
- b) Negativo: pico de flauta púrpura/extremo inferior amarillo, sólo fermentación de glucosa. ^{41,42}

Prueba de Citrato de Simmons

1. Pesar con precisión la cantidad que se indica en la etiqueta.
2. Rehidratar con agua destilada o desionizada.
3. Calentar suavemente la solución.
4. Distribuir aproximadamente 5 mL por tubo con tapa de rosca.
5. Esterilizar a 121 °C, 15 lb, 15 min.
6. Enfriar en una posición inclinada.
7. Inocular por estría cruzada en el pico de flauta y punción con asa recta al fondo del tubo, los microorganismos en estudio en tubos diferentes, correctamente etiquetados cada uno.
8. Incubar A 35 °C por 24-48 horas. Puede requerir una incubación prolongada (hasta 4 días).

Interpretación:

1. Positivo (+): Crecimiento con un intenso color azul en el pico de la flauta.
2. Negativo (-): Ausencia de crecimiento y ningún cambio en el color (verde).³⁹

Prueba Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MR/VP)

1. Pesar con precisión la cantidad que se indica en la etiqueta del RM-VP.
2. Rehidratar con agua destilada o desionizada.
3. Calentar suavemente la solución.
4. Distribuir aproximadamente 5 mL por tubo con tapa de rosca.
5. Esterilizar a 121 °C, 15 lb, 15 min.
6. Inocular livianamente el microorganismo en estudio.

Prueba Rojo de metilo

1. Agregare al tubo 2-3 gotas de rojo de metilo.
2. Incubar A 35 °C por 18-24 horas.

Prueba Voges-Proskauer

3. Agregara otro tubo diferente de el de rojo de metilo, 3 gotas de la solución de α -Naftol 5%
4. Agitar vigorosamente el tubo
5. Agregar 3 gotas de la solución de Hidróxido de Potasio (KOH) 40%.
6. Agitar vigorosamente

7. Incubar A 35 °C por 18-24 horas. Puede requerir una incubación prolongada (hasta 2 días).

Interpretación:

Prueba Rojo de metilo

1. Positivo (+): Color rojo en el medio.
2. Negativo (-): Color amarillo original del medio.

Prueba Voges-Proskauer

1. Positivo (+): Color rosado-rojo en la superficie del medio (acetoina presente).
2. Negativo (-): Color amarillo en la superficie del medio (igual color que el reactivo). Puede formarse un color cobrizo, pero es un resultado negativo (debido a la acción de los reactivos cuando se mezclan).⁴³

RESULTADOS

Se elaboraron 200 capilares con inóculo de 45 µL cada uno para las bacterias *pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* y *Salmonella enteritidis*, mediante un micrométodo de crioconservación propuesto en el laboratorio 1 de la UMIEZ, posteriormente se evaluó la viabilidad de las bacterias antes mencionadas de manera mensual durante un lapso de seis meses y también se realizaron pruebas bioquímicas al inicio y al final de los seis meses de estudio, con el fin de indicar que las bacterias permanecieron sin cambio alguno en su bioquímica enzimática durante este tiempo.

En la imagen 22, 23, 24 y 25 se muestra cada uno de los tubos Eppendorff con tapa de rosca que contiene a los 200 tubos capilares para cada una de las 4 cepas bacterianas de la familia *Enterobacteriaceae*.

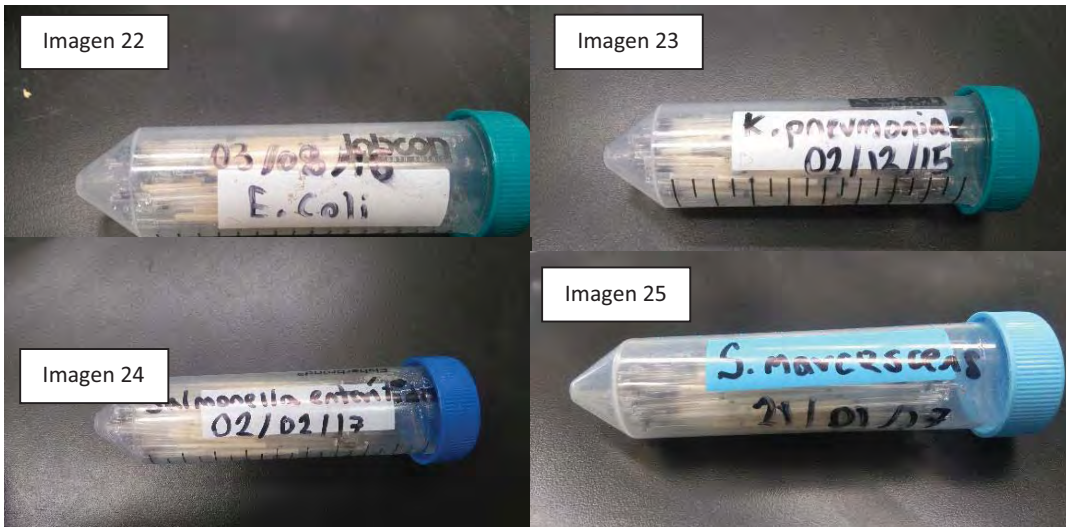


Imagen 22,23, 24, 25.- Tubos Eppendorff donde se resguardan los capilares de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enteritidis* y *S. marcescens* para su posterior congelación, cada uno tiene rotulado su fecha de elaboración.

En la imagen 26, 27, 28 y 29 se observa un tubo capilar para cada una de las cepas en estudio, para su reactivación los tubos capilares son abiertos por los bordes con un lápiz diamante en condiciones de esterilidad, para poder ser inoculados en Caldo Soya-Trypticaseina, estos caldos inoculados con las bacterias son incubados durante 24 horas a 37 °C.

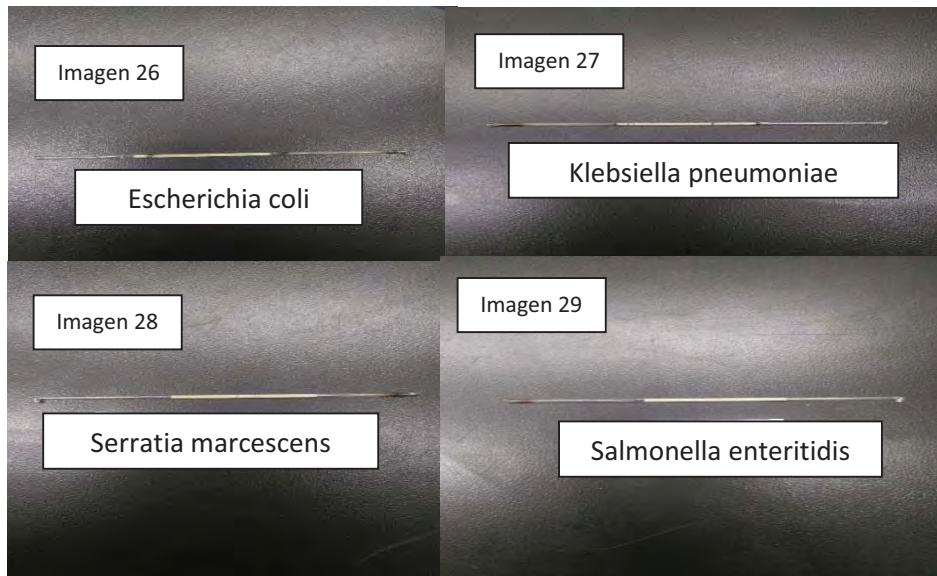


Imagen 26, 27, 28, 29.- Tubos capilares donde se resguarda cada una de las bacterias *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enteritidis* y *S. marcescens* inoculada en el agente crio-protector (Leche Svelty).

En la imagen 30,31, 32 y 33 se observa la turbidez que se presentó en cada uno de los tubos de Caldo Soya-Trypticaseina posterior a la reactivación de los capilares e incubación por 24 horas a 37 °C.

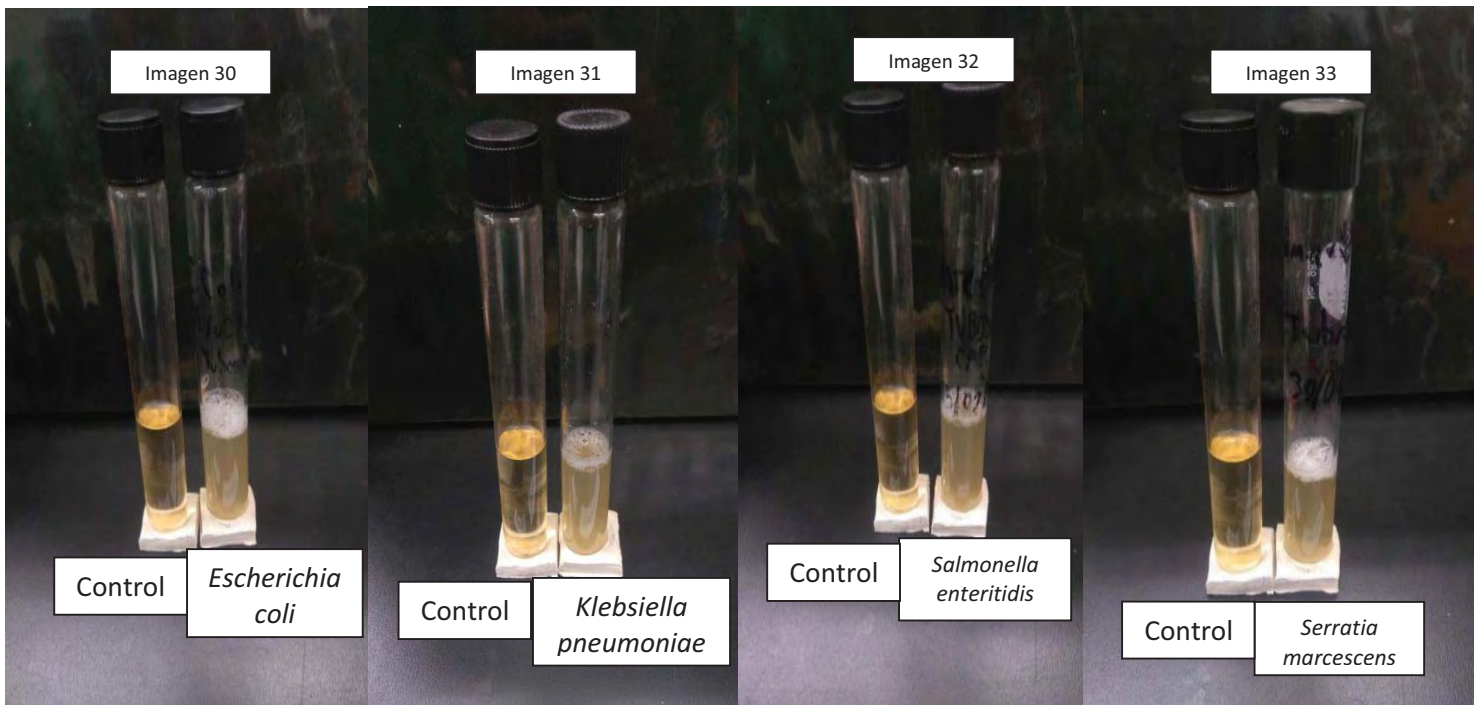


Imagen 30, 31, 32 y 33.- Tubos de Caldo Soya-Trypticaseina donde se logra observar la turbidez de los tubos inoculados con las bacterias *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* y *S. enteritidis*. Comparado cada uno con su muestra control sin inoculo.

En la imagen 34, 35, 36 y 37 se aprecia la inoculación por estría cruzada en agar Soya-Trypticaseina, de cada una de las bacterias a partir de los caldos Soya-Trypticaseina mencionado en la imagen 30, 31, 32 y 33.

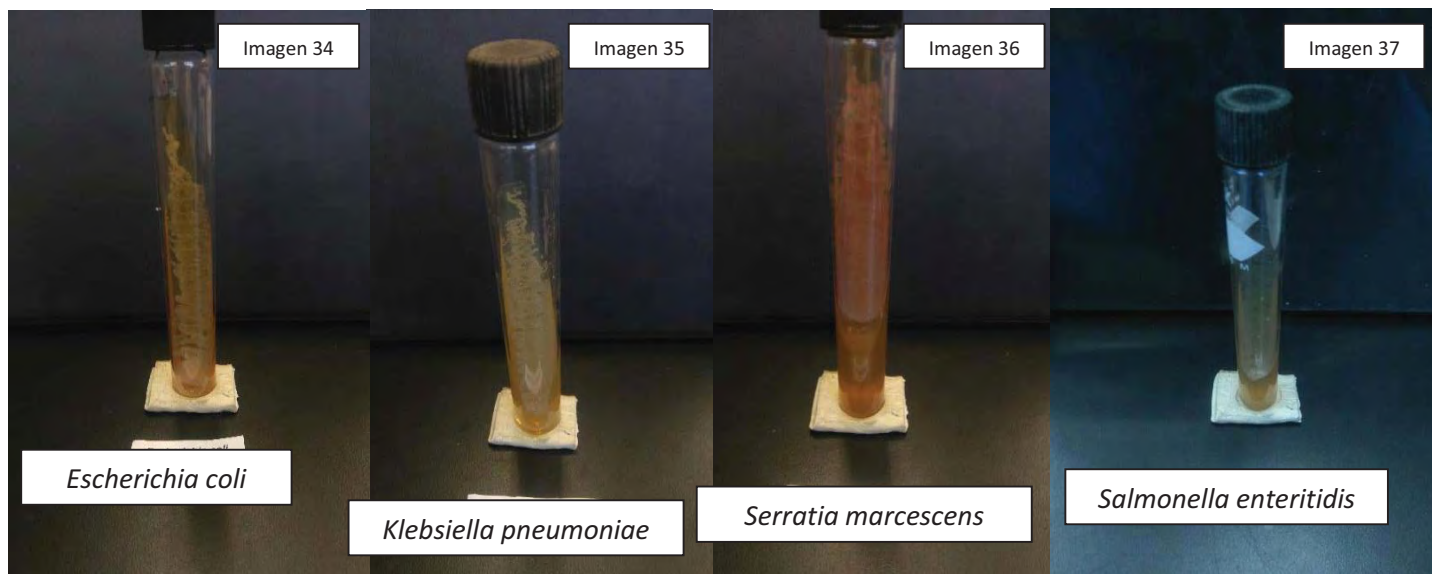


Imagen 34, 35, 36 y 37.- Tubos pico de flauta de Agar Soya-Trypticaseina con inoculación de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* y *S. enteritidis* por estría cruzada.

A las Enterobacterias en estudio se les realizaron controles de calidad para verificar la confiabilidad del micrométodo de crioconservación, esto se llevó a cabo mediante la realización de un frotis y tinción de Gram, con el fin de corroborar la existencia de bacilos Gram negativos mediante un ensayo al microscopio (Objetivo 100x). Al mismo tiempo se realiza un ensayo macroscópico con diferentes medios selectivos para observar la morfología colonia de las Enterobacterias en estudio, así como la realización de pruebas bioquímicas al inicio y al término de los seis meses, para su identificación completa. Por último la viabilidad de dichas bacterias fue evaluada mediante la técnica de vertido en placa a tres temperaturas (-24 °C, 4 °C y temperatura ambiente) a las cuales se conservaron los tubos capilares de las bacterias en estudio de manera mensual, por un lapso de seis meses.

Prueba de viabilidad

En los siguientes cuadros (10, 11, 12 y 13) se registraron los resultados de la prueba de viabilidad para cada una de las Enterobacterias en estudio, a tres diferentes temperaturas de manera mensual por un lapso de seis meses, mediante la técnica de vertido en placa.

Cuadro 10. Resultados de viabilidad por vertido en placa de *Escherichia coli*

Mes/°C	-24 °C	4 °C	Temp. ambiente
0	Incontable	Incontable	Incontable
1	Incontable	Incontable	Incontable
2	Incontable	Incontable	Incontable
3	Incontable	Incontable	Moderado*
4	Incontable	Incontable*	Moderado*
5	Incontable	Incontable*	Nulo*
6	Incontable	Moderado*	Nulo*

*Al momento de reactivar las cepas, se tuvo que dejar el tubo capilar dentro del caldo soya-tripticaseína que se iba a incubar, debido a que su contenido se había secado.

Cuadro 11. Resultados de viabilidad por vertido en placa de *K. pneumoniae* caldo

Mes/°C	-24 °C	4 °C	Temp. Ambiente
0	Incontable	Incontable	Incontable
1	Incontable	Incontable	Incontable
2	Incontable	Incontable	Incontable
3	Incontable	Incontable	Incontable*
4	Incontable	Incontable*	Incontable*
5	Incontable	Incontable*	Moderado*
6	Incontable	Incontable*	Nulo*

*Al momento de reactivar las cepas, se tuvo que dejar el tubo capilar dentro del caldo soya-tripticaseína que se iba a incubar, debido a que su contenido se había secado.

Cuadro 12. Resultados de viabilidad por vertido en placa de *S. enteritidis*

Mes/°C	-24 °C	4 °C	Temp. ambiente
0	Incontable	Incontable	Incontable
1	Incontable	Incontable	Incontable
2	Incontable	Incontable	Incontable
3	Incontable	Incontable	Moderado*
4	Incontable	Incontable*	Nulo*
5	Incontable	Moderado*	Nulo*
6	Incontable	Moderado*	Nulo*

*Al momento de reactivar las cepas, se tuvo que dejar el tubo capilar dentro del caldo soya-tripticaseína que se iba a incubar, debido a que su contenido se había secado.

Cuadro 13. Resultados de viabilidad por vertido en placa de *Serratia marcescens*

Mes/°C	-24 °C	4 °C	Temp. Ambiente
0	Incontable	Incontable	Incontable
1	Incontable	Incontable	Incontable
2	Incontable	Incontable	Incontable
3	Incontable	Incontable	Moderado*
4	Incontable	Incontable*	Nulo*
5	Incontable	Moderado*	Nulo*
6	Incontable	Moderado*	Nulo*

*Al momento de reactivar las cepas, se tuvo que dejar el tubo capilar dentro del caldo soya-tripticaseína que se iba a incubar, debido a que su contenido se había secado.

Identificación de *Escherichia coli*

Cuadro 14. Morfología colonial de *Escherichia coli* en Agar EMB

Característica	Agar EMB
Color	Verde metálico
Tamaño	1 mm
Forma	Puntiforme
Borde	Redondo
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Cremosa
Otras	Pigmento verde metálico por la fermentación rápida de la lactosa

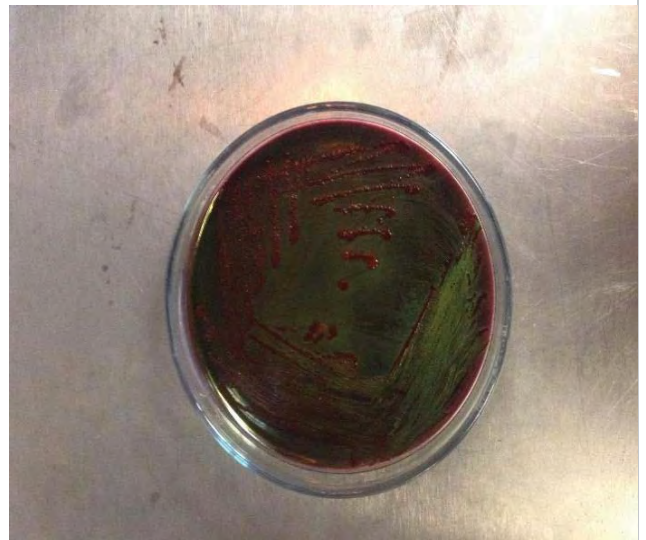


Imagen 38.- *E. coli* en agar EMB se observan colonias oscuras con brillo verde metálico en los bordes.

Cuadro 15. Morfología colonial de *Escherichia coli* en Agar CPS

Característica	Agar CPS
Color	Café-rojizo
Tamaño	1-2 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Mate
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Pastosa
Otras	El color marron rojizo de las colonias es debido a la presencia de β -glucuronidasa.

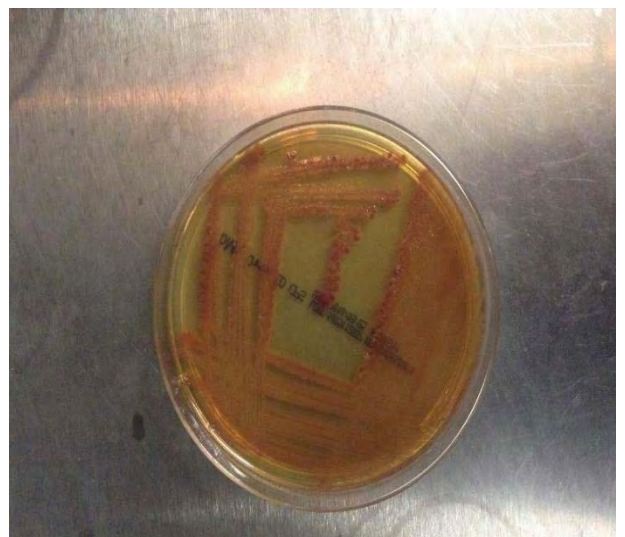


Imagen 39.- *E.coli* en agar CPS se observa colonias café rojizo, debido a la acción de la enzima β -glucuronidasa

Tinción de Gram de *Escherichia coli*

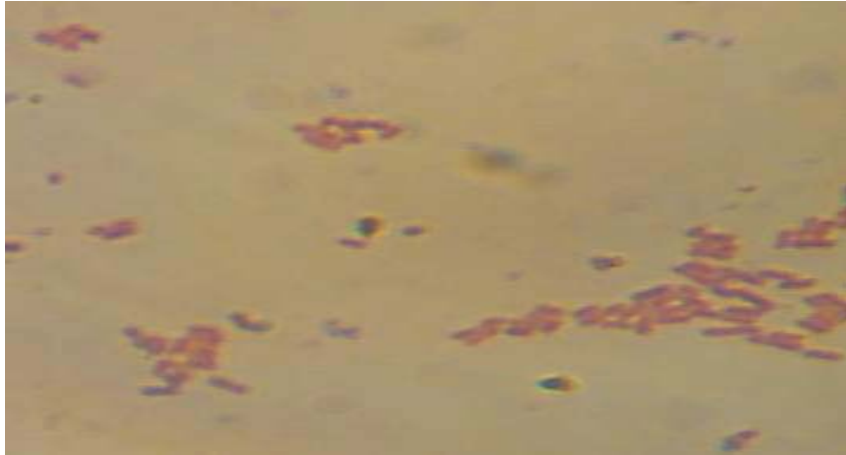


Imagen 40.- Tinción de Gram de *E. coli* al sexto mes de crioconservación, bacilos Gram negativo, objetivo 100x.

Cuadro 16. Pruebas KIA y LIA de *Escherichia coli* al mes 0 y 6

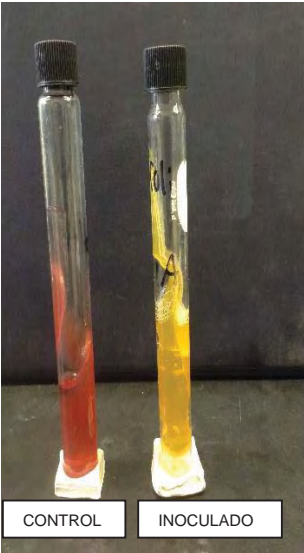
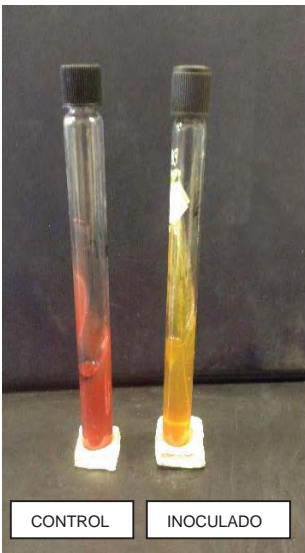
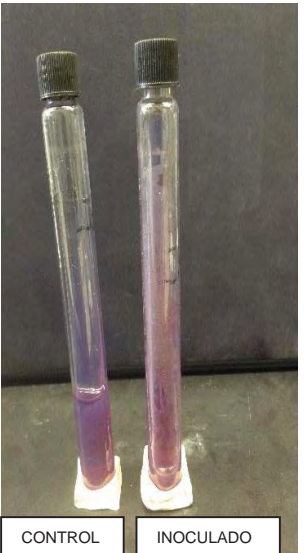

KIA		LIA	
MES 0	MES 6	MES 0	MES 6
			
CONTROL INOCULADO	CONTROL INOCULADO	CONTROL INOCULADO	CONTROL INOCULADO

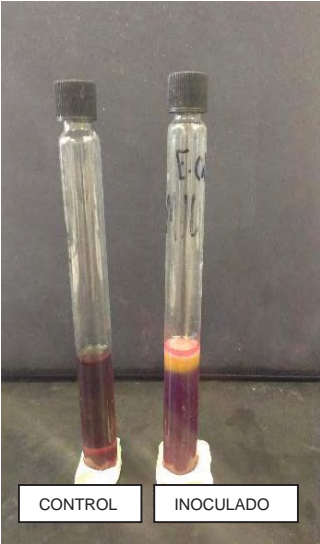

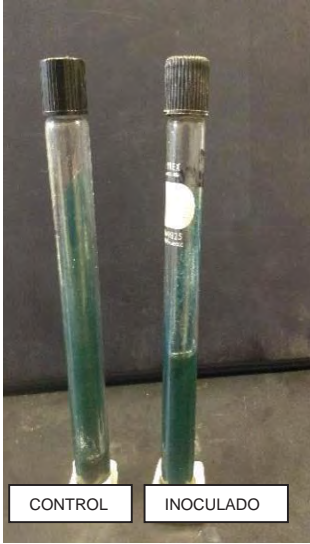

Imagen 41. *E. coli* fermenta lactosa y glucosa, produciendo gas abundantemente

Imagen 42. *E. coli* fermenta lactosa y glucosa, produciendo gas



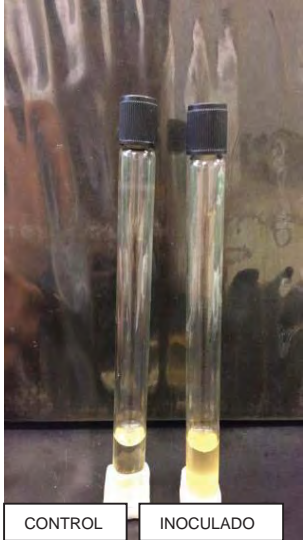

Imagen 43. *E. coli*, tiene descarboxilación de la lisina positiva.

Imagen 44. *E. coli* presenta la enzima lisina descarboxilasa.

Cuadro 17. Pruebas MIO y Citrato de Simmons de *Escherichia coli* al mes 0 y 6

MIO		Citrato de Simmons	
MES 0	MES 6	MES 0	MES 6
			
CONTROL INOCULADO	CONTROL INOCULADO	CONTROL INOCULADO	CONTROL INOCULADO
Imagen 45. <i>E. coli</i> es positivo a movilidad, indol y ornitina	Imagen 46. <i>E. coli</i> es positivo a movilidad, indol y ornitina	Imagen 47. <i>E. coli</i> no utiliza el citrato como fuente de carbono	Imagen 48. <i>E. coli</i> no utiliza el citrato como fuente de carbono

Cuadro 18. Pruebas RM y VP de *Escherichia coli* al mes 0 y 6

Rojo de Metilo		Voges-Proskauer	
MES 0	MES 6	MES 0	MES 6
			
CONTROL INOCULADO	CONTROL INOCULADO	CONTROL INOCULADO	CONTROL INOCULADO
Imagen 49. coloración roja por la presencia de ácidos orgánicos,	Imagen 50. Positivo a RM por la presencia de ácidos orgánicos	Imagen 51. <i>E. coli</i> no oxida el acetilmetilcarbinol.	Imagen 52. <i>E. coli</i> no oxida el acetilmetilcarbinol.

Cuadro 19. Pruebas de fermentación de *Escherichia coli* al mes 0 y 6
 Fermentación de Glucosa, Sacarosa y Lactosa

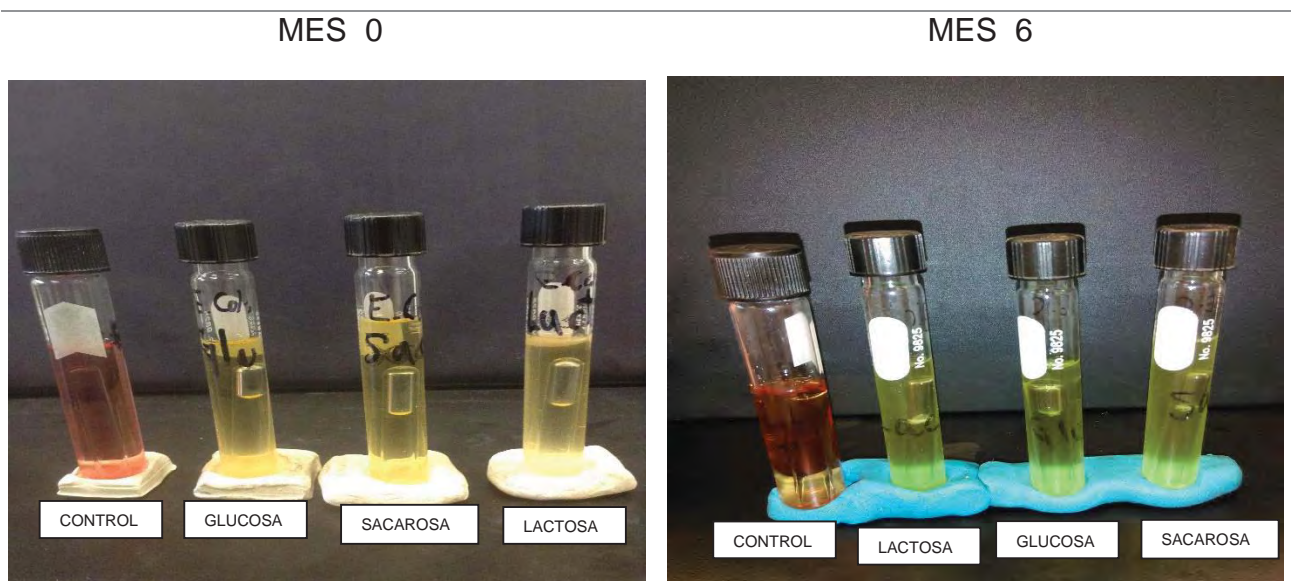


Imagen 53. Color amarillo en el medio debido a la fermentación de las azúcares, así como producción de gas para glucosa, sacarosa y lactosa.

Imagen 54. Color amarillo debido a la fermentación de las azúcares, así como producción de gas para glucosa, sacarosa y lactosa.

Cuadro 20. Resultados de las pruebas bioquímicas de *Escherichia coli*

MES 0		MES 6	
Prueba Bioquímica	Resultado	Prueba Bioquímica	Resultado
KIA	Ácido/Ácido; Gas	KIA	Ácido/Ácido; Gas
LIA	Lisina descarboxilasa: (+) Pico de flauta púrpura/Fondo púrpura	LIA	Lisina descarboxilasa: (+) Pico de flauta púrpura /Fondo púrpura
MIO	Motilidad: (+) Indol: (+) Ornitina Descarboxilasa: (+)	MIO	Motilidad: (+) Indol: (+) Ornitina Descarboxilasa: (+)
I	Indol: (+)	I	Indol: (+)
M	Rojo de Metilo: (+)	M	Rojo de Metilo: (+)
Vi	Voges Proskauer: (-)	Vi	Voges Proskauer: (-)
C	Citrato: (-)	C	Citrato: (-)

Identificación de *Klebsiella pneumoniae*

Cuadro 21. Morfología colonial de *Klebsiella pneumoniae* en Agar CPS

Característica	Agar CPS
Color	Verde pálido
Tamaño	1 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Ligeramente elevada
Superficie	Lisa brillante
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Traslúcida
Consistencia	Mucosa
Otras	Colonias verdes debido a la actividad de β -glucosidasa

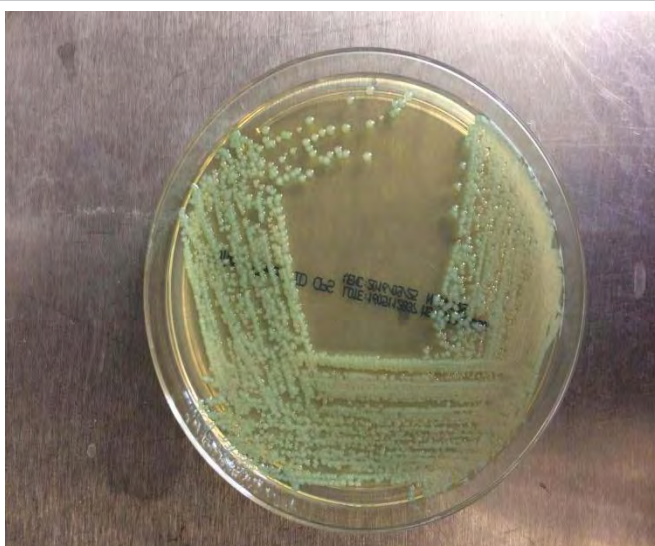


Imagen 55.- *K. pneumoniae* en agar CPS se observa colonias verde pálido, debido a una mayor actividad de β -glucosidasa

Cuadro 22. Morfología colonial de *Klebsiella pneumoniae* en Agar EMB

Característica	Agar EMB
Color	Purpura
Tamaño	2-3 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Elevada
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Mucosa
Otras	Fermentación de lactosa



Imagen 56.- *K. pneumoniae* en agar EMB se observan colonias rosas con textura mucoides por la presencia de cápsula.

Tinción de Gram de *Klebsiella pneumoniae*

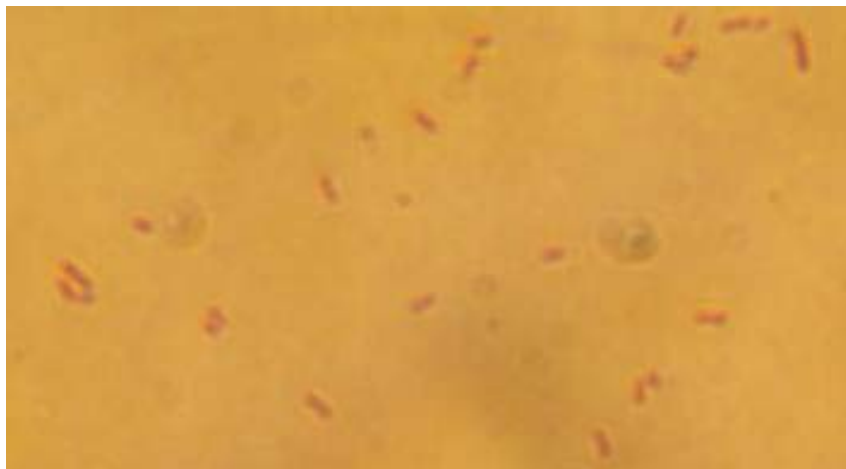


Imagen 57.- Tinción de Gram de *K. pneumoniae* al sexto mes de crioconservación, bacilos Gram negativo, objetivo 100x.

Cuadro 23. Pruebas KIA y LIA de *Klebsiella pneumoniae* al mes 0 y 6

KIA		LIA	
MES 0	MES 6	MES 0	MES 6

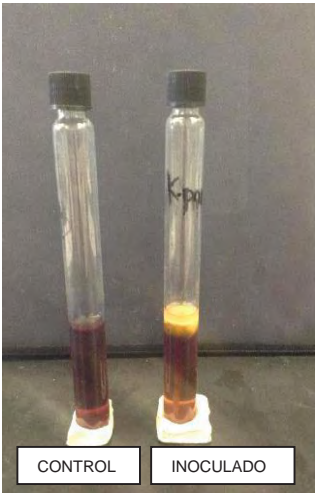
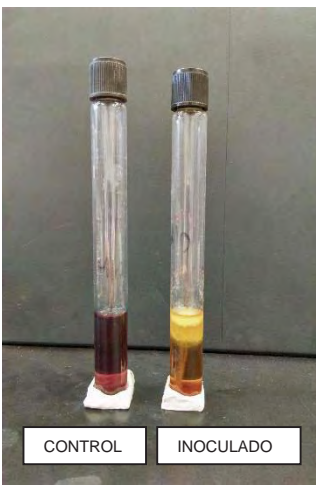
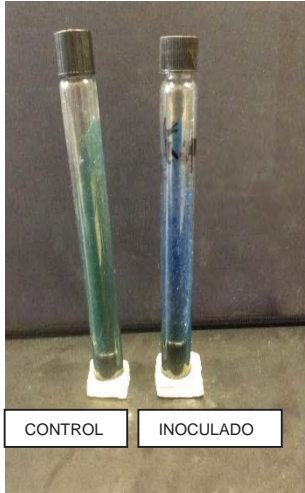

Imagen 58. *K. pneumoniae* fermenta lactosa y glucosa, con poca producción de gas.

Imagen 59. *K. pneumoniae* fermenta lactosa y glucosa, con poca producción de gas.

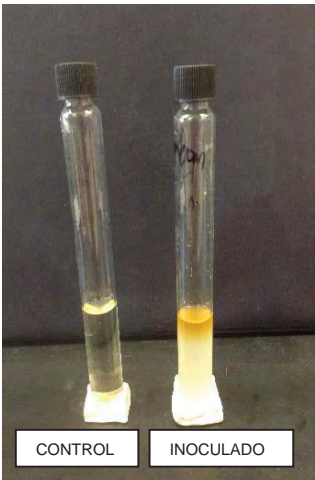

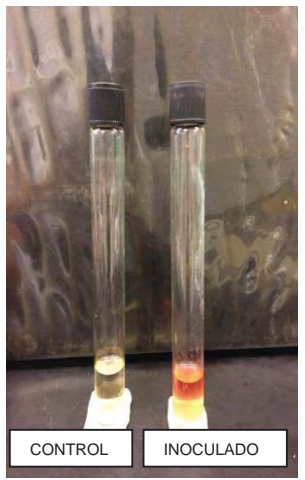

Imagen 60. *K. pneumoniae* tiene descarboxilación de la lisina positiva.

Imagen 61. *K. pneumoniae* presenta la enzima lisina descarboxilasa

Cuadro 24. Pruebas MIO y Citrato de *S. de Klebsiella pneumoniae* al mes 0 y 6

MIO		Citrato de Simmons	
MES 0	MES 6	MES 0	MES 6
 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>
<p>Imagen 62. <i>K. pneumoniae</i> es negativo a movilidad, indol y ornitina descarboxilasa.</p>	<p>Imagen 63. <i>K. pneumoniae</i> es negativo a movilidad, indol y ornitina descarboxilasa.</p>	<p>Imagen 64. <i>K. pneumoniae</i> si utiliza el citrato como única fuente de carbono.</p>	<p>Imagen 65. <i>K. pneumoniae</i> si utiliza el citrato como única fuente de carbono.</p>

Cuadro 25. Pruebas RM y VP de *Klebsiella pneumoniae* al mes 0 y 6

Rojo de Metilo		Voges-Proskauer	
MES 0	MES 6	MES 0	MES 6
 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>
<p>Imagen 66. Coloración amarilla por la ausencia de ácidos orgánicos.</p>	<p>Imagen 67. Coloración amarilla por la ausencia de ácidos orgánicos.</p>	<p>Imagen 68. <i>K. pneumoniae</i> oxida el acetilmetilcarbinol.</p>	<p>Imagen 69. <i>K. pneumoniae</i> oxida el acetilmetilcarbinol.</p>

Cuadro 26. Pruebas de fermentación de *Klebsiella pneumoniae* al mes 0 y 6
 Fermentación de Glucosa, Sacarosa y Lactosa

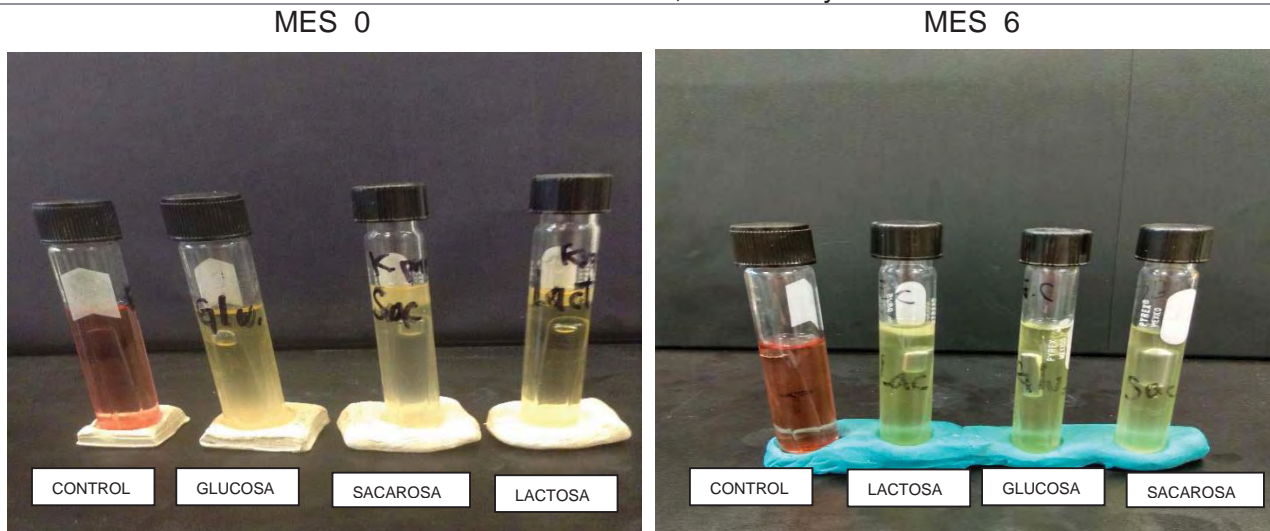


Imagen 70. Color amarillo en el medio indicando la fermentación de las azúcares, así como producción de gas para glucosa, sacarosa y lactosa.

Imagen 71. Color amarillo en el medio indicando la fermentación de las azúcares, así como producción de gas para glucosa, sacarosa y lactosa.

Cuadro 27. Resultados de las pruebas bioquímicas de *Klebsiella pneumoniae*.

MES 0		MES 6	
Prueba Bioquímica	Resultado	Prueba Bioquímica	Resultado
KIA	Ácido/Ácido; con poca producción de Gas	KIA	Ácido/Ácido; con poca producción de Gas
LIA	Lisina descarboxilasa: (+) Pico de flauta púrpura/Fondo púrpura	LIA	Lisina descarboxilasa: (+) Pico de flauta púrpura/Fondo púrpura
MIO	Motilidad: (-) Indol: (-) Ornitina Descarboxilasa: (-)	MIO	Motilidad: (-) Indol: (-) Ornitina Descarboxilasa: (-)
I	Indol: (-)	I	Indol: (-)
M	Rojo de Metilo: (-)	M	Rojo de Metilo: (-)
Vi	Voges Proskauer: (+)	Vi	Voges Proskauer: (+)
C	Citrato: (+)	C	Citrato: (+)

Identificación de *Salmonella enteritidis*

Cuadro 28. Morfología colonial *Salmonella enteritidis* en ChromID *Salmonella* Elite

Característica	Agar <i>Salmonella</i> Elite
Color	Morado
Tamaño	1-2 mm
Forma	Irregular
Borde	Redondo
Elevación	Plana
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Cremosa
Otras	Colonias morado intenso



Imagen 72.- *S. enteritidis* en agar ChromID *Salmonella* Elie con colonias morado intenso.

Cuadro 29. Morfología colonial *Salmonella enteritidis* en Agar S-S

Característica	Agar S-S
Color	Incoloras centro negro
Tamaño	1 mm
Forma	Puntiforme
Borde	Ondulado
Elevación	Convexa
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Opaca
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Membranosa
Otras	No se fermenta la lactosa y se forma Sulfuro de Hierro(III) (ennegrecimiento de las colonias)



Imagen 73.- *S. enteritidis* en agar S-S no presenta fermentación de la lactosa y es H₂S (+)

Tinción de Gram de *Salmonella enteritidis*

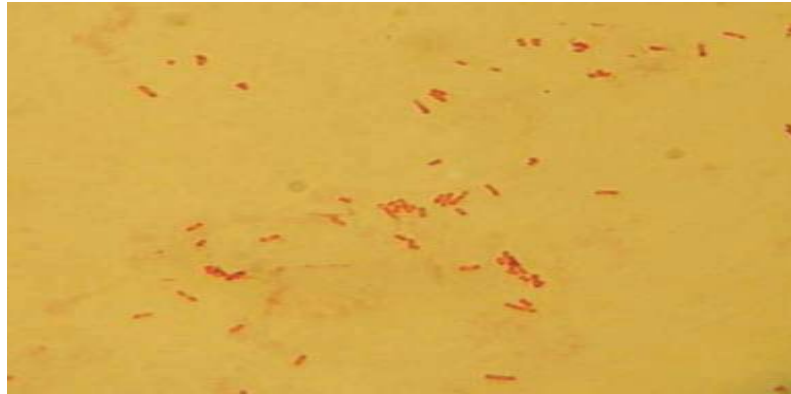
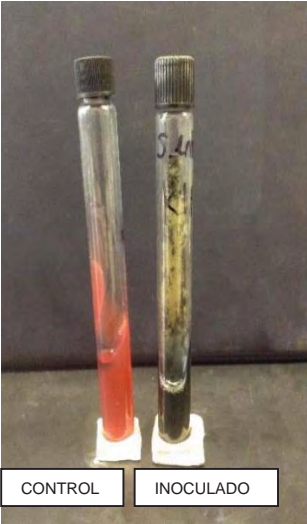

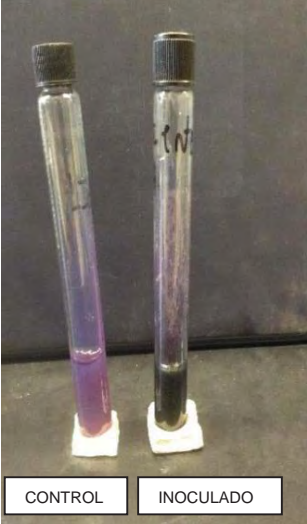

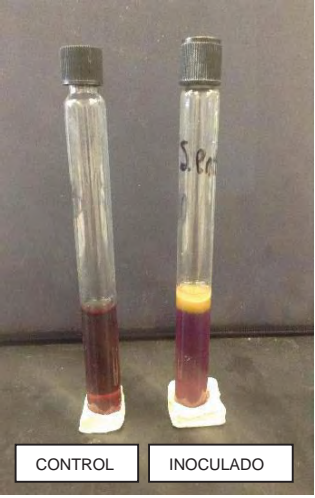





Imagen 74.- Tinción de Gram de *S. enteritidis* al sexto mes de crioconservación, bacilos Gram negativo, objetivo 100x.




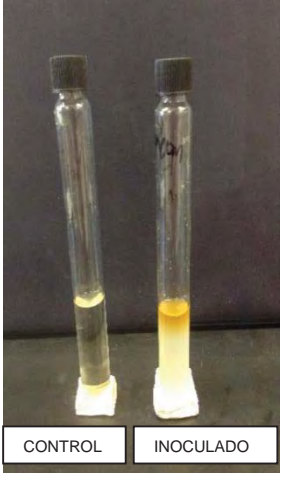
Cuadro 30. Pruebas KIA y LIA de *Salmonella enteritidis* al mes 0 y 6

KIA		LIA	
MES 0	MES 6	MES 0	MES 6
 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>
<p>Imagen 75. <i>S. enteritidis</i> fermenta glucosa con ennegrecimiento del medio.</p>	<p>Imagen 76. <i>S. enteritidis</i> fermenta glucosa con ennegrecimiento del medio.</p>	<p>Imagen 77. <i>S. enteritidis</i> descarboxila la lisina, con ennegrecimiento del medio.</p>	<p>Imagen 78. <i>S. enteritidis</i> descarboxila la lisina, con ennegrecimiento del medio.</p>

Cuadro 31. Pruebas MIO y Citrato de Simmons de *Salmonella enteritidis* al mes 0 y 6

MIO		Citrato de Simmons	
MES 1	MES 6	MES 1	MES 6
 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>
<p>Imagen 79. <i>S. enteritidis</i> es negativo a indol y positivo a movilidad y ornitina descarboxilasa.</p>	<p>Imagen 80. <i>S. enteritidis</i> es negativo a indol y positivo a movilidad y ornitina descarboxilasa.</p>	<p>Imagen 81. <i>S. enteritidis</i> si utiliza los citratos como única fuente de carbono.</p>	<p>Imagen 82. <i>S. enteritidis</i> si utiliza los citratos como fuente de carbono.</p>

Cuadro 32. Pruebas RM y VP de *Salmonella enteritidis* al mes 0 y 6

Rojo de Metilo		Voges-Proskauer	
MES 0	MES 6	MES 0	MES 6
 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>
<p>Imagen 83. Coloración roja por la presencia de ácidos orgánicos.</p>	<p>Imagen 84. Coloración roja por la presencia de ácidos orgánicos.</p>	<p>Imagen 85. <i>S. enteritidis</i> no oxida el acetilmetilcarbinol.</p>	<p>Imagen 86. <i>S. enteritidis</i> no oxida el acetilmetilcarbinol.</p>

Cuadro 33. Pruebas de fermentación de *Salmonella enteritidis* al mes 0 y 6
 Fermentación de Glucosa, Sacarosa y Lactosa

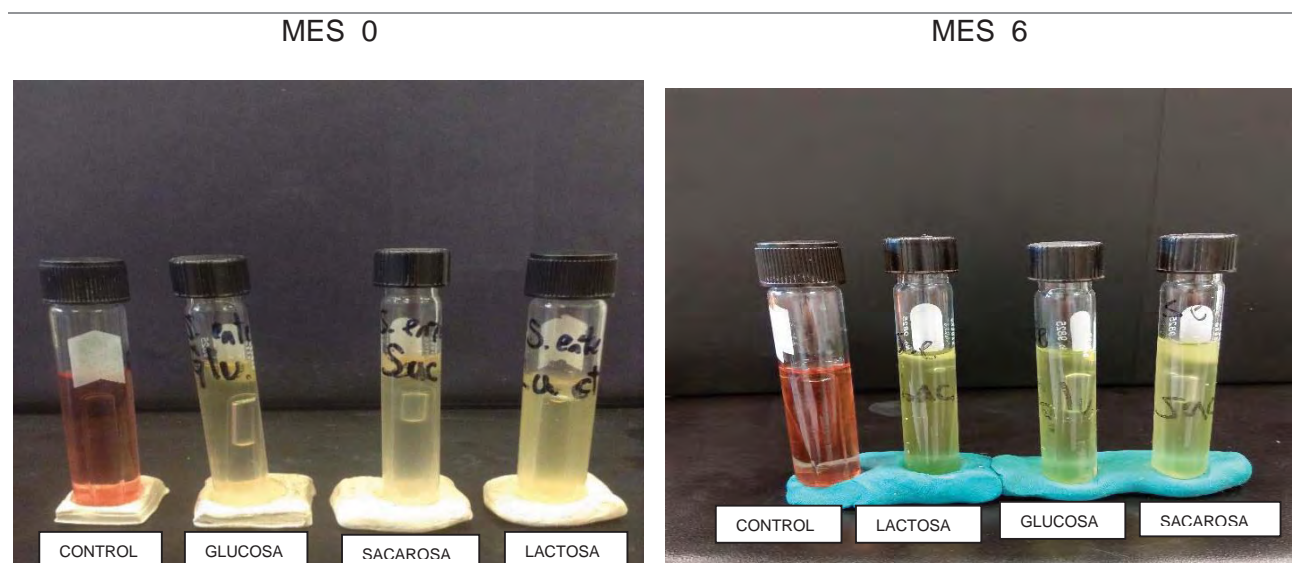


Imagen 87. Color amarillo en el medio indicando presencia de ácidos orgánicos, así como producción de gas para glucosa, sacarosa y casi nula para lactosa.

Imagen 88. Color amarillo en el medio indicando presencia de ácidos orgánicos, así como producción de gas para glucosa, sacarosa y nula para lactosa.

Cuadro 34. Resultados de las pruebas bioquímicas de *Salmonella enteritidis*.

MES 0		MES 6	
Prueba Bioquímica	Resultado	Prueba Bioquímica	Resultado
KIA	Básico /Ácido y H ₂ S (+)	KIA	Básico /Ácido y H ₂ S (+)
LIA	Lisina descarboxilasa: (+) /H ₂ S (+) Pico de flauta púrpura/Fondo púrpura	LIA	Lisina descarboxilasa: (+) /H ₂ S (+) Pico de flauta púrpura/Fondo púrpura
MIO	Motilidad: (+) Indol: (-) Ornitina Descarboxilasa: (+)	MIO	Motilidad: (+) Indol: (-) Ornitina Descarboxilasa: (+)
I	Indol: (-)	I	Indol: (-)
M	Rojo de Metilo: (+)	M	Rojo de Metilo: (+)
Vi	Voges Proskauer: (-)	Vi	Voges Proskauer: (-)
C	Citrato: (+)	C	Citrato: (+)

Identificación de *Serratia marcescens*

Cuadro 35. Morfología colonial de *Serratia marcescens* en Agar B.H.I.

Característica	Agar B.H.I.
Color	Rojo Opaco
Tamaño	1 mm
Forma	irregular
Borde	Irregulares
Elevación	Plana
Superficie	Convexa
Luz reflejada	Opaca
Luz transmitida	Opaca
Consistencia	Pastosa
Otras	Colonias rojas por la presencia de la pigmento prodigiosina

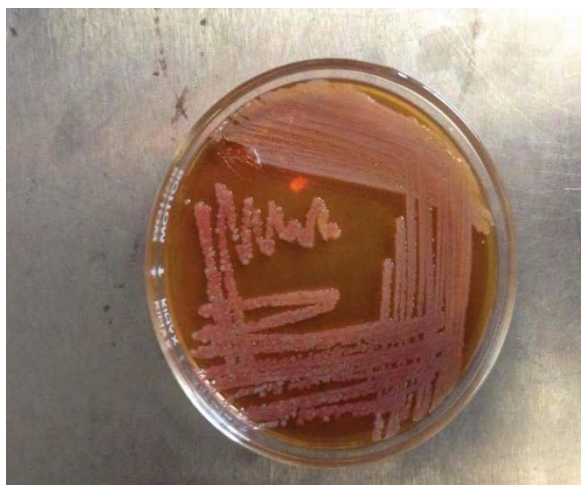


Imagen 89.- colonias rojas características de *S. marcescens* al expresarse como metabolito secundario la prodigiosina

Cuadro 36. Morfología colonial de *Serratia marcescens* en Agar CPS

CARACTERÍSTICA	Agar CPS
Color	Verde claro
Tamaño	1-2 mm
Forma	Circular
Borde	Redondo
Elevación	Ligeramente elevada
Superficie	Lisa
Luz reflejada	Brillante
Luz transmitida	Traslúcida
Consistencia	Pastosa
Otras	Colonias verdes debido a al aumento de la actividad de la β -glucosidasa

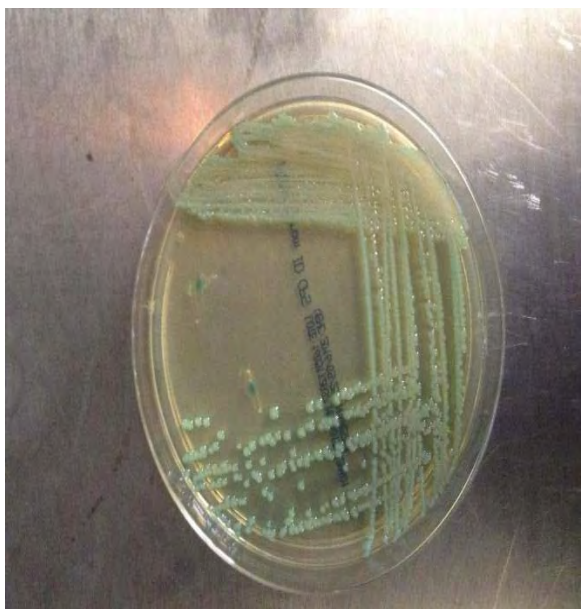


Imagen 90.- *S. marcescens* en agar CPS, colonias verde claro, debido a una mayor actividad de la β -glucosidasa.

Tinción de Gram de *Serratia marcescens*



Imagen 91.- Tinción de Gram de *S. marcescens* al sexto mes de crioconservación, bacilos Gram negativo, objetivo 100x.

Cuadro 37. Pruebas KIA y LIA de *Serratia marcescens* al mes 0 y 6

KIA		LIA	
MES 0	MES 6	MES 0	MES 6

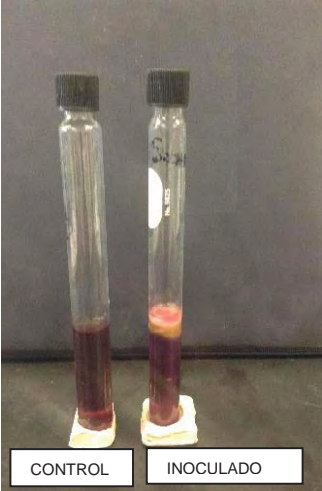
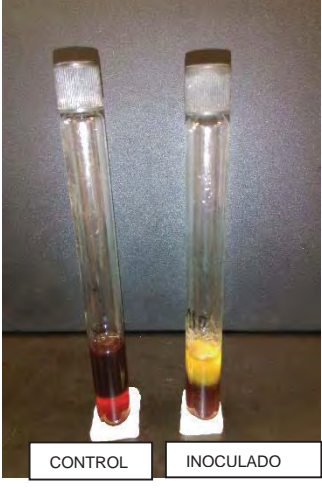
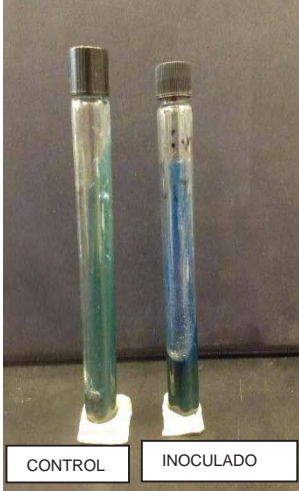

Imagen 92. *S. marcescens* fermenta solo la glucosa, con producción abundante de gas.

Imagen 93. *S. marcescens* fermenta la glucosa, con poca producción de gas.


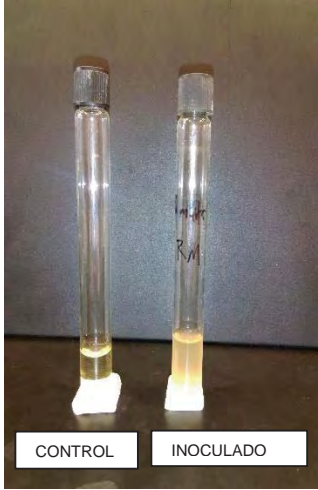
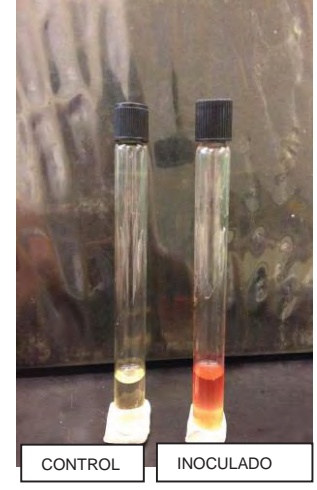

Imagen 94. *S. marcescens* descarboxila la lisina.

Imagen 95. *S. marcescens* descarboxila la lisina.

Cuadro 38. Pruebas MIO y Citrato de Simmons de *Serratia marcescens* al mes 0 y 6

MIO		Citrato de Simmons	
MES 0	MES 6	MES 1	MES 6
 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>
<p>Imagen 96. <i>S. marcescens</i> es positivo a movilidad, indol y ornitina descarboxilasa.</p>	<p>Imagen 97. <i>S. marcescens</i> es positivo a movilidad, y ornitina descarboxilasa, para indol es negativo</p>	<p>Imagen 98. <i>S. marcescens</i> utiliza los citratos como única fuente de carbono.</p>	<p>Imagen 99. <i>S. marcescens</i> utiliza los citratos como fuente de carbono.</p>

Cuadro 39. Pruebas RM y VP de *Serratia marcescens* al mes 0 y 6

Rojo de Metilo		Voges-Proskauer	
MES 0	MES 6	MES 0	MES 6
 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>	 <p>CONTROL INOCULADO</p>
<p>Imagen 100. Coloración amarilla por la ausencia de ácidos orgánicos.</p>	<p>Imagen 101. Coloración tenue amarillenta por la ausencia de ácidos orgánicos.</p>	<p>Imagen 102. <i>S. marcescens</i> oxida el acetilmetilcarbinol.</p>	<p>Imagen 103. <i>S. marcescens</i> oxida el acetilmetilcarbinol</p>

Cuadro 40. Pruebas de fermentación de *Serratia marcescens* al mes 0 y 6
 Fermentación de Glucosa, Sacarosa y Lactosa

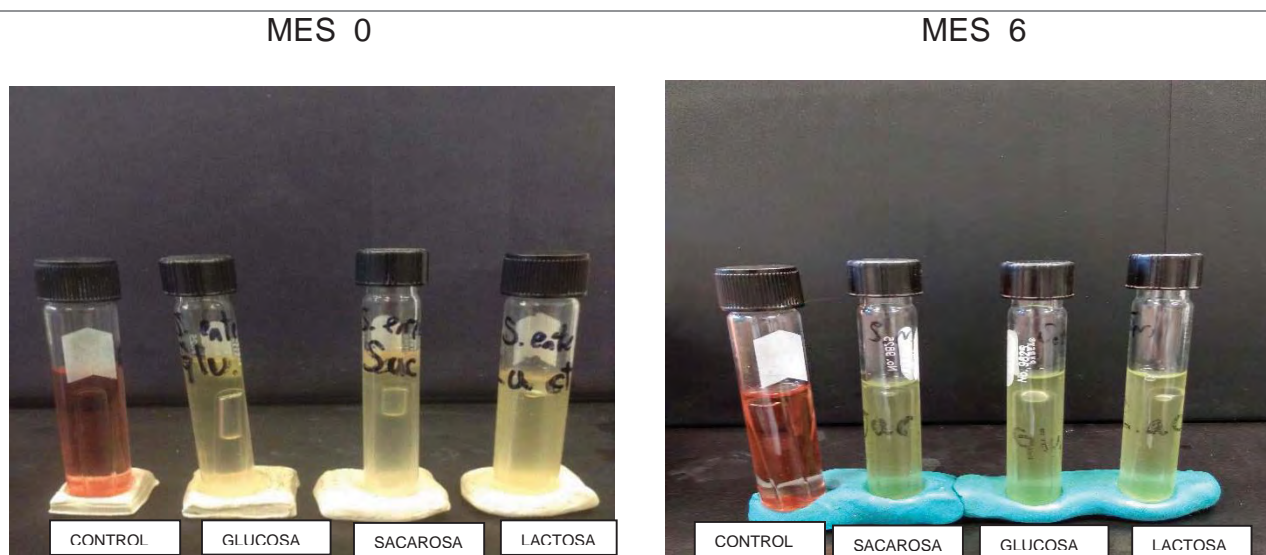


Imagen 104. Color amarillo en el medio indicando presencia de ácidos orgánicos, así como producción de gas para glucosa, sacarosa y nula para lactosa.

Imagen 105. Color amarillo en el medio indicando presencia de ácidos orgánicos, así como producción de gas para glucosa, sacarosa y casi nula para lactosa.

Cuadro 41. Resultados de las pruebas bioquímicas de *Serratia marcescens*.

MES 0		MES 6	
Prueba Bioquímica	Resultado	Prueba Bioquímica	Resultado
KIA	Básico /Ácido: Gas	KIA	Básico /Ácido: Gas
LIA	Lisina descarboxilasa: (+) Pico de flauta púrpura/Fondo púrpura	LIA	Lisina descarboxilasa: (+) Pico de flauta púrpura/Fondo púrpura
MIO	Motilidad: (+) Indol: (+) Ornitina Descarboxilasa: (+)	MIO	Motilidad: (+) Indol: (+) Ornitina Descarboxilasa: (+)
I	Indol: (+)	I	Indol: (-)
M	Rojo de Metilo: (-)	M	Rojo de Metilo: (-)
Vi	Voges Proskauer: (+)	Vi	Voges Proskauer: (+)
C	Citrato: (+)	C	Citrato: (+)

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este apartado se analizan los resultados obtenidos al finalizar las pruebas de morfológica microscópica, morfología colonial, viabilidad y bioquímicas realizadas a las cepas en estudio (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens*) durante seis meses de conservación a tres diferentes temperaturas.

PRUEBA DE VIABILIDAD

En el cuadró 10 se muestran los resultados de la prueba de viabilidad por vertido en placa de la cepa *Escherichia coli* durante seis meses, inicialmente para la temperatura de -24 °C de almacenamiento, el micrométodo de crioconservación fue satisfactoria durante cada uno de los seis meses de prueba, con respecto a la temperatura de 4 °C de almacenamiento, el micrométodo de crioconservación fue satisfactoria hasta el 5to mes de prueba, y por último en la temperatura ambiente el micrométodo de crioconservación fue satisfactoria hasta el segundo mes, cabe mencionar que en la temperatura de 4 °C y temperatura ambiente a partir del tercer mes se comenzó a secar el contenido de los capilares, por lo cual se tuvo que dejar el tubo capilar dentro del caldo soya-tripticaseina que se iba a incubar, ya que no era posible sacar su contenido para la reactivación del mismo, con el fin de evaluar si continuaban viables las cepas en estudio. Con los resultados antes obteniendo, el micrométodo de crioconservación es solamente satisfactorio en una temperatura de -24 °C ya que a menores temperaturas el contenido de los capilares se seca impidiendo su correcta reactivación.

En el cuadró 11 se muestran los resultados de la prueba de viabilidad por vertido en placa de la cepa *Klebsiella pneumoniae* durante seis meses, primeramente para las temperaturas de -24 °C y 4 °C de almacenamiento, el micrométodo de crioconservación fue satisfactoria durante cada uno de los seis meses de prueba, con respecto a la temperatura ambiente el micrométodo de crioconservación fue satisfactoria hasta el segundo mes, cabe mencionar que en las temperatura de 4 °C y temperatura ambiente a partir del tercer mes se comenzó a secar el contenido de los capilares, por lo cual se tuvo que dejar el tubo capilar dentro del caldo soya-tripticaseina que se iba a incubar, para la reactivación del mismo. La cepa *Klebsiella pneumoniae* al poseer cápsula como organelo de resistencia, se mantuvo viable seis meses a dos temperatura diferentes (-24 °C y 4 °C), sin embargo al secarse el contenido de los capilares almacenados a las temperaturas de 4 °C y temperatura ambiente, sólo la temperatura que -24 °C es satisfactoria para implementar el micrométodo de crioconservación en a la cepa *Klebsiella pneumoniae*.

En los cuadro 12 y 13 se muestran los resultados de la prueba de viabilidad por vertido en placa de las cepas *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens*, inicialmente para ambas cepas el micrométodo de crioconservación fue satisfactorio a la temperatura de -24 °C de almacenamiento durante cada uno de los seis meses

de prueba, caso diferente con respecto a las temperaturas de 4 °C y temperatura ambiente donde sólo fue satisfactorio el micrométodo de crioconservación hasta el cuarto y segundo mes respectivamente, sin mencionar que a estas dos temperaturas de almacenamiento, el contenido de los capilares se secaba, por lo cual se tuvo que dejar el tubo capilar dentro del caldo soya-tripticaseina que se iba a incubar, con el fin de evaluar si continuaban viables los cepas en estudio.

Los resultados anteriores analizados nos reflejan que el Micrométodo de Crioconservación Zaragoza fue favorable para las bacterias en estudio a la temperatura de almacenamiento de -24 °C por seis meses, por otro lado en las temperaturas de 4 °C y temperatura ambiente, el contenido de los capilares comenzaba a secar impidiendo su reactivación a partir del tercer y cuarto mes de almacenamiento, por lo cual se vuelve insatisfactorio el resguardo de los capilares a estas temperaturas.

ANÁLISIS MICROSCÓPICO

En este apartado se presentan imágenes de las tinciones de Gram realizadas a todas las cepas en estudio crioconservadas a -24 °C, siendo estas preparaciones enfocadas a 100x en un microscopio PRIMO STAR ZEISS, con el fin de verificar la pureza de las cepas y que la morfología microscópica de las mismas se mantenía sin alteraciones, aunque las tinciones de Gram fueron realizadas de manera mensual a partir de las cepas reactivadas, solamente se presentan como muestra representativa las tinciones obtenidas al sexto mes de crioconservación. Para el caso de la bacteria *Escherichia coli* en la imagen 40 se presentaban bacilos Gram negativos delgados bien definidos iguales a los visualizados antes y durante la crioconservación, de la misma manera para *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* se tomó muestra los caldos soya-tripticaseina donde se reactivó cada cepa, se realizó tinción de Gram y se lograron visualizar en las imágenes 57, 74 y 91 respectivamente bacilos Gram negativos delgados bien definidos. Determinando después del sexto mes de pruebas que las enterobacterias en estudio crioconservadas por el micrométodo Zaragoza no presentaban cambios significativos en su morfología microscópica, teniendo todas formas bacilares, teñidas de color rosa por la utilización de la safranina como colorante de contraste, como lo marca la literatura para las bacterias Gram negativas.

ANÁLISIS MACROSCÓPICO

Las cepas en estudio fueron inoculadas antes y después de la implementación del micrométodo de crioconservación Zaragoza a temperatura de almacenamiento de -24 °C en diferentes medios selectivos, diferenciales y cromogénicos con el fin de

evaluar la morfología colonial en 2 diferentes medios para cada cepa, en la cual se tomaron en cuenta los aspectos de forma, bordes, tamaño, color, consistencia, elevación, luz transmitida y luz reflejada de las colonias presentes en cada medio.

- *Escherichia coli* (EMB y CPS)

La cepa de *Escherichia coli* posterior a los seis meses de crioconservación presenta en agar EMB colonias de aproximadamente 1 mm de diámetro, de forma puntiforme, con elevación convexa, de superficie lisa, brillante, de consistencia cremosa, con un color oscuro en el centro de sus colonias y un brillo verde metálico alrededor de las mismas, siendo esta una característica principal en cepas que fermentan la lactosa de manera rápida como lo reporta la literatura para la bacteria *E. coli*, como se ejemplifica en el cuadro 14. Bajo el mismo procedimiento la cepa crionservada de *Escherichia coli* fue inoculada en agar cromogénico CPS dando colonias de entre 1 y 2 mm de diámetro, de forma circular, con elevación convexa, de superficie lisa, opaca, de consistencia pastosa, presentando colonias de color marrón rojizo, esta tonalidad en las colonias nos indica un aumento de la enzima β -glucuronidasa como se puede observar en el cuadro 15, siendo la misma tonalidad que reporta Biomérieux la empresa fabricante del agar cromogénico CPS para la bacteria *Escherichia coli*.

- *Klebsiella pneumoniae* (EMB y CPS)

La cepa de *Klebsiella pneumoniae* posterior a los seis meses de crioconservación, presenta en agar EMB colonias de aproximadamente 2 y 3 mm de diámetro, de forma circular, con elevación convexa, de superficie lisa, brillante, de consistencia mucoide, siendo esta una característica principal en cepas que presentan cápsula como organelo de resistencia, el color de las colonias se aprecia rosado-purpura sin presencia de brillos metálico alrededor de las colonias como se muestra en el cuadro 22. De la misma manera la cepa crionservada de *Klebsiella pneumoniae* fue inoculada en agar cromogénico CPS dando colonias de 1 mm de diámetro, de forma circular, con elevación ligeramente elevada, de superficie lisa, brillante, de consistencia mucoide, con un color verde pálido muy común en bacterias del tipo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacteria*, *Serratia*, *Citrobacter*) debido a la presencia de la enzima β -glucosidasa como se puede observar en el cuadro 21.

- *Salmonella enteritidis* (Salmonella Elite y S-S)

La cepa de *Salmonella enteritidis* posterior a los seis meses de crioconservación, presenta en agar ChromID *Salmonella* Elite colonias de aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro, de forma irregular, con elevación plana, de superficie lisa, brillante, de

consistencia cremosa, de color púrpura intenso siendo esta una característica principal en del género *Salmonella spp* como se ejemplifica en el cuadro 28. De la misma manera la cepa crionservada de *Salmonella enteritidis* fue inoculada en agar Salmonella-Shigella, dando colonias de 1 mm de diámetro, de forma puntiforme, con elevación convexa, de superficie lisa, opaca, de consistencia membranosa, con colonias de color negro debido a que la bacteria en su metabolismo genera ácido sulfhídrico y este al reaccionar con el hierro del medio, forma sulfuro de hierro (III) como se puede observar en el cuadro 29.

- *Serratia marcescens* (BHI y CPS)

La cepa de *Serratia marcescens* posterior a los seis meses de crioconservación, presenta en agar BHI colonias de aproximadamente de 1 mm diámetro, de forma irregular, con elevación plana, de superficie convexa, opaca, de consistencia pastosa, de color rojo opaco lo cual nos indica la expresión del pigmento llamado prodigiosina el cual es un metabolito secundario de color rojo característico en el género *Serratia spp* como se ejemplifica en el cuadro 35. De la misma manera la cepa crionservada de *Serratia marcescens* fue inoculada en agar cromogénico CPS, dando colonias de 1 a 2 mm de diámetro, de forma circular, ligeramente elevadas, de superficie lisa, brillantes, de consistencia pastosa, con un color verde pálido muy común en bacterias del tipo KESC (*Klebsiella, Enterobacteria, Serratia, Citrobacter*) debido a la presencia de la enzima β -glucosidasa como se puede observar en el cuadro como se puede observar en el cuadro 36.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Con el fin de corroborar que la bioquímica enzimática de cada una de las cepas en estudio había permanecido inalterada posterior a los seis meses de implementación del micrométodo de crioconservadas se realizaron las pruebas bioquímicas Citrato de Simmons, MIO, KIA, LIA, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y fermentación de carbohidratos (sacarosa, lactosa, glucosa) al inicio y al final de los seis meses de prueba.

- Citrato de Simmons

En la prueba bioquímica Citrato de Simmons, *Escherichia coli* presenta crecimiento en el pico de flauta del tubo inclinado, sin vire en el color original del medio (verde) como se muestra en imágenes 47 y 48. Al no generarse vire en el medio, no se presentó aumento en el pH y por lo tanto el indicador azul de bromotimol permaneció de color verde (pH ácido) ya que *E. coli* no tiene la capacidad de utilizar el citrato y las sales de amonio como única fuente de carbono y de nitrógeno respectivamente, lo cual es un resultado negativo.

Por otro lado *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* tuvieron un resultado positivo, ya que estas bacterias tienen la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono, esto gracias a que poseen la enzima citrato permeasa que desdobla el citrato progresivamente en oxalacetato y piruvato, este último se desdobla en dióxido de carbono y agua, formándose rápidamente carbonatos y bicarbonatos que alcalinizan el medio haciendo virar el indicador azul de bromotimol de verde a azul, como se muestra en las imágenes 64 y 65 para *K. pneumoniae* así como las imágenes 81 y 82 para *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* como se muestra en las imágenes 98 y 99. Cabe mencionar que para la prueba Citrato de Simmons ninguna de las bacterias presento cambios al realizar la prueba bioquímica al inicio y al final de los seis meses de prueba.

- KIA

Escherichia coli y *Klebsiella pneumoniae* en agar KIA, presentan un vire en el color original del medio de rojo a amarillo tanto en el fondo como en el pico de flauta con producción abundante de gas para *E. coli* y poca producción de gas para *K. pneumoniae*, esto es debido a la fermentación de la glucosa y lactosa del medio, produciéndose ácidos orgánicos, que disminuir el pH del medio, virando el indicador rojo de fenol a color amarillo con producción de CO₂ como se muestran en las imágenes 41 y 42 para *E. coli* y con respecto a *K. pneumoniae* en la imágenes 58 y 59 se muestran lo antes descrito.

Salmonella enteritidis presenta un vire en el color original del medio de rojo a amarillo sólo en el fondo del tubo, debido a la fermentación de la glucosa, siendo este vire enmascarado casi por completo por el ennegrecimiento del medio que es debido a que *Salmonella enteritidis* reduce el tiosulfato de sodio a sulfuro de hidrógeno, el cual reacciona con las sales de hierro, formándose sulfuro de hierro el cual tiene un color negro característico del medio como se muestra en las imágenes 75 y 76, esto es un resultado positivo para la prueba de sulfuro de hidrogeno.

Serratia marcescens genera un vire en el color original del medio de rojo a amarillo, pero solamente en el fondo del tubo inclinado, ya que sólo fermenta la glucosa con producción de ácidos orgánicos y formación abundante de CO₂, lo cual deforma ligeramente el medio, como se aprecia en las imágenes 92 y 93.

Para ninguna de las bacterias al inicio y al término de los seis meses de ensayo, se presentaron cambios en la prueba bioquímica KIA.

- LIA

Para la prueba Lisina Hierro Agar las bacterias *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens* presenta crecimiento en el pico de flauta del tubo inclinado posterior

a su incubación, con un vire de color violeta opaco a un violeta intenso indicándonos que tiene la capacidad de descarboxilar la lisina por acción de la enzima lisina descarboxilasa, produciendo la amina cadaverina, que alcaliniza el medio generando el vire del indicador purpura de bromocresol ya que este indicador a pH mayor de 6.8 tiene una tonalidad purpura intensa como se observa en las imágenes 43 y 44 para *E. coli* y las imágenes 60, 61 y 94, 95 respectivamente para *K. pneumoniae* y *S. marcescens*, dando estas tres bacterias un resultado positivo a la prueba de Lisina descarboxilasa.

Salmonella enteritidis de la misma manera presenta un resultado positivo a la prueba de Lisina descarboxilasa, teniendo crecimiento en el pico de flauta del tubo inclinado y vire de violeta opaco a violeta intenso debido a la alcalinización del medio por la descarboxilación de la lisina, pero este vire es enmascarado casi por completo por el ennegrecimiento del medio, debido a que *S. enteritidis* reduce el tiosulfato de sodio a sulfuro de hidrógeno, el cual reacciona con las sales de hierro, formándose sulfuro de hierro el cual tiene un color negro característico del medio como se muestra en las imágenes 77 y 78, esto es un resultado positivo para la prueba de sulfuro de hidrógeno. Al inicio y al final de los seis meses de ensayo no se presentaron cambio en los resultados de la prueba LIA.

- MIO

Escherichia coli generó enturbiamiento del medio y surcos de crecimiento más allá de la línea de inoculación, indicándonos que esta bacteria es flagelada, posteriormente al agregar en el medio el reactivo de Kovac se formó un anillo rojo en la superficie indicado la utilización del aminoácido triptófano para producir indol, por último el medio tuvo un vire de color de violeta opaco a violeta intenso ya que *E. coli* descarboxila la ornitina, produciéndose la amina putrecina, que alcaliniza el medio y esto produce el vire del indicador púrpura de bromocresol, como se observa en las imágenes 45 y 46, dando un resultado positivo a las pruebas de Indol, Movilidad y Ornitina descarboxilasa.

Para la bacteria *Klebsiella pneumoniae* de modo contrario a *E. coli*, no generó turbidez en el medio indicando que la prueba de movilidad es negativa, para la prueba de indol al agregar el reactivo de Kovac la bacteria *K. pneumonia* produjo un anillo de tonalidad amarilla en la superficie del medio lo cual nos indica resultado negativo debido a que esta bacteria no posee la enzima tritofanasa que desdobra el triptófano en indol, por último el medio presento un vire de color de purpura opaco a amarillo por la fermentación de la glucosa produciendo ácidos orgánicos que disminuyen el pH originando el vire en el indicador púrpura de bromocresol, siendo un resultado negativo ya que la ornitina en el medio no pudo ser descarboxilasa, como se puede apreciar en las imágenes 62 y 63.

Finalmente *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* presentaron turbidez en el medio con surcos de crecimiento desprendidos de la línea de inoculación inicial, lo cual nos indica que estas bacterias presentan movilidad por medio de flagelos, de la misma manera ambas bacterias presentaron un vire en el medio de violeta opaco a violeta intenso ya que poseen la enzima ornitina descarboxilasa que descarboxila la ornitina generando la amina putrecina, que aumenta el pH modificando el color en el medio por acción del indicador púrpura de bromocresol, dando resultado positivo ambas bacterias a la prueba ornitina descarboxilasa, como se observa en las imágenes 79, 80 y 96, 97 para *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* respectivamente. Por último al agregar al medio MIO el reactivo de Kovac posterior a la inoculación e incubación de los tubos, la bacteria *Salmonella enteritidis* presentó un anillo rojo en la superficie indicado la utilización del aminoácido triptófano para producir indol por acción de la enzima triptofanasa, es importante remarcar que para la bacteria *Serratia marcescens* al realizar la segunda prueba de indol al finalizar los seis meses de ensayo, se vio un cambio con respecto al resultado inicial, en el resultado inicial se puede observar la aparición del anillo rojo por la formación de indol a partir de triptófano posterior a añadir el reactivo de Kovac (imagen 96) y en el segundo resultado de la prueba de indol se observa un anillo amarillo que nos indica que no se está produciendo indol (imagen 97), estos dos resultados diferentes pueden ser tomados ambos como resultados correctos debido a que de acuerdo con el Manual de Pruebas Bioquímicas McFaddin *Serratia marcescens* presentan variabilidad positiva y negativa en sus resultados para la prueba de indol con reactivo de Kovac.

- Rojo de metilo / Vogues-Proskauer

Para la prueba de Rojo de Metilo las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis* presentaron un color rojo en el medio al agregar el indicador rojo de metilo, este color es debido a la fermentación de la glucosa del medio por la vía ácido mixta produciendo ácidos orgánicos lo cual hacen que el pH disminuya a una escala menor que 4.2, que es el valor de pH al cual el indicador presenta su color rojo característico, como se muestra en las imágenes 49, 50 y 83, 84 para *E. coli* y *S. enteritidis* respectivamente, ambas bacterias presentaron un resultado positivo para esta prueba.

Con respecto *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* al agregar el indicador rojo de metilo se presenta un color amarillo en el medio, este color se debe a la fermentación butilenglicólica de la glucosa produciendo piruvato el cual se descarboxila y posteriormente se reduce formando un producto neutro llamado acetilmetilcarbinol que aumenta el pH por encima de la escala de 6.2, que es el valor de pH al que el indicador rojo de metilo vira a amarillo, como se puede observar en

las imágenes 66, 67 y 100, 101 para *K. pneumoniae* y *S. marcescens* respectivamente.

De la misma manera en la prueba de Vogues-Proskauer, para las bacterias *Escherichia coli* (imágenes 51 y 52) y *Salmonella enteritidis* (imágenes 85 y 86) al añadir el hidróxido de potasio al 40% y alfa naftol al 5%, respectivamente se forma una coloración amarilla en la superficie del caldo, dicha coloración en el medio es debida a que estas bacterias no tiene la capacidad metabólica de producir acetilmetilcarbinol (acetoina) a partir de glucosa por la vía fermentativa butilenglicólica. Caso contrario al que presentan *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* los cuales al llevar el mismo tratamiento con hidróxido de potasio y alfa naftol presentaron una tonalidad rojiza en la superficie del tubo como se muestra en las imágenes 68 , 69 y 102, 103 respectivamente para *K. pneumoniae* y *S. marcescens*, la coloración antes mencionada es debió a que estas bacterias producen acetoina a partir de glucosa por fermentación butilenglicólica, la acetoina en el medio reacciona con el alfa naftol en presencia de una base fuerte, deshidratando la acetoina en diacetal el cual en presencia de peptonas en el medio forma una coloración rojiza.

- Fermentación de carbohidratos

Para esta prueba se utilizan como carbohidratos glucosa, sacarosa y lactosa; posterior a las 24 horas de incubación *Escherichia coli* así como *Klebsiella pneumoniae* generaron un vire en color original del medio de rojo a amarillo intenso y dentro de las campanas de Durham se encontraban burbujas de gas, siendo este el mismo resultado para los tres carbohidratos antes mencionados para ambas bacterias tiene la capacidad de fermentar la glucosa, sacarosa y lactosa con formación de dióxido de carbono en forma de gas así como ácidos orgánicos que disminuye el pH del medio a una escala menor que 6.8 generando el vire en el indicado rojo de fenol a amarillo como se puede visualizar en la imagen 53, 54 y 70, 71 para *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente.

Por otro lado las bacterias *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* también presentaron un vire en el color original de medio de rojo a amarillo por acción del indicador rojo de fenol que a pH menor a 6.8 presenta una tonalidad amarilla, pero al observar las campanas de Durham para glucosa, sacarosa y lactosa de ambas bacterias, solamente se apreció burbujas de dióxido de carbono en los tubos de glucosa y sacarosa, diciéndonos que estas bacterias son lactosa negativas ya que no tiene la capacidad de fermentar la lactosa con formación de ácidos orgánicos y dióxido de carbono, como se aprecia en las imágenes 87 y 88 para *Salmonella enteritidis* donde no se puede percibir burbujas de gas dentro de la campana de

Durham para lactosa donde *Serratia marcescens* en las imágenes 104 y 105 se observa que presenta una burbuja muy pequeña en la campana de Durham la cual es casi imperceptible.

Como análisis final de este apartado de pruebas bioquímicas anteriormente mencionadas, la cepas criopreservadas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* no presentaron cambios significativos en su bioquímica enzimática puesto que ninguna de las pruebas bioquímicas a las que fue sometida al inicio y al final de los seis meses presentó un resultado diferente al reportado en el Manual de Pruebas Bioquímicas McFaddin.

CONCLUSIONES

Con respecto al objetivo general del presente proyecto se logra adaptar el micrométodo de criopreservación Zaragoza a las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* de la familia *Enterobacteriaceae*.

También se logran realizar las técnicas de control de calidad para las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* preservadas por el micrométodo de criopreservación Zaragoza comprobando que este método de conservación bacteriana logra mantener la morfología colonial, morfología microscópica y estabilidad bioquímica de las bacterias durante los seis meses de prueba.

Por último se determinó que las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis* y *Serratia marcescens* adaptadas al micrométodo de criopreservación Zaragoza a -24 °C, son viables durante los seis meses de prueba.

Obteniendo un método de criopreservación a -24 °C reproducible, de bajo costo, que requiere poco espacio de almacenaje, sin la necesidad de resiembras periódicas, de menor impacto ambiental con respecto a métodos tradicionales y con el alcance de mantener la viabilidad y estabilidad bioquímica de las bacterias en estudio por un periodo de tiempo de al menos seis meses.

PERSPECTIVAS

- Realizar un cepario utilizando el micrométodo de criopreservación Zaragoza.
- Realizar mensualmente reactivación de los capilares, tinción de Gram y aislamiento por estría cruzada en medios diferenciales y selectivos.

- Continuar con el estudio de viabilidad de las cepas crioconservadas, con el fin de comprobar hasta que lapso de tiempo es eficiente el micrométodo de crioconservación Zaragoza para estos microorganismos.
- Realizar la prueba de viabilidad de las cepas crioconservadas, mediante el método de número más probable para cuantificación de microorganismos viables totales.

REFERENCIAS

1. Biodiversidad mexicana. Bacterias [internet]. No date [consulta 2017 Feb 23]. Disponible en: http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/Bacterias/bacteria.html.
2. Universidad nacional autónoma de México. Departamento de microbiología y parasitología [internet]. No date [consulta 2017 Enero 17]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidad.es.html>
3. Metabolismo bacteriano [internet]. c2016 [actualizado 2014 Oct 14; [Consulta 2017 Marzo 20]. Disponible en: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.mx/2014/10/metabolismo-bacteriano.html>
4. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 5a ed. Barcelona España: Editorial Elsevier; 2008.
5. Estructuras y Funciones de los Organismos Eucariotas [internet]. c2016 [Actualizado: 2016 consulta: 2017 Abril 02]. Disponible en: <https://apuntesambientalejos.files.wordpress.com/2008/11/microbiologia-2.doc>
6. Facultad de Bioquímica y ciencias Biológicas. Guía para la conservación de microorganismos. Cátedra microbiológica General. UNL 1999.
7. Ribbons DW. Methods in microbiology. Vol. 3 Newport: Editorial J.R. Norris, Academic Press; 1970.
8. Romero CR. Microbiología y Parasitología Humana. 3a ed. México: Editorial Médica panamericana; 2007.
9. American Type Culture Collection [internet]. c2016 [Actualizado: 2016 consulta 2017 Abril 02]. Disponible en: <https://www.atcc.org/About>
10. John Melloni, Biagio. Ida Dox, Editorial Reverte *Diccionario médico ilustrado de Melloni*. 1982 p. 74.
11. Puerta F, Mateos R. Enterobacterias Unidad de Enfermedades Infecciosas. 2ª ed. España: Editorial Albacete; 2009.
12. Willey M, Sherwood M, Woolverton J, Microbiología de Prescott, Harley y Klein. 7ª ed. España: Editorial Mc Graw Hill., 2009.
13. Serrano S., Marfil R., Jodral M. Patógenos emergentes en la línea de sacrificio porcino; fundamentos de seguridad alimentaria. Editorial Díaz de Santos. España; 2009.

14. Romano L., Murguía T., Pérez V. Brote de bacteremia nosocomial y colonización por *Serratia marcescens* en una Unidad de Cuidado Intensivo Neonatal. Boletín médico del Hospital Infantil de México. Vol.64 No. 1; 2007.
15. Hodano Y., Kamiya T., Uenishi N. A fatal case of infective endocarditis caused by an unusual suspect *Serratia marcescens*. Internal Medicine; 2011. 28
16. Finegold SM, Martin WJ. Diagnostico Microbiológico. 6ª Ed. Buenos aires: Editorial medica panamericana;1983.
17. Walker ST. Microbiologia.1ª Ed. Mexico: Editorial McGraw Hill;2000.
18. Collins CH, Lyne PM. Métodos microbiológicos. 5ª Ed. España: Editorial Acribia; 1989.
19. Biomerieux. Medios cromogénicos: chromID Salmonella/Hektoen [internet]. c2016 [Actualizado 2016 Sep 04; consulta 2017 Abril 10]. Disponible en: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/24-chromid-salmonella---hektoen>
20. García P, Fernández M, Paredes F. Microbiología Clínica Aplicada. 3ª ed. Editorial Díaz de Santos. México: 1998.
21. Bailey & Scott. Diagnostico microbiológico. 12ª Ed. Buenos aires: Editorial médica panamericana; 2009.
22. Instituto de salud pública Ministerio de salud [internet]. c2011 [actualizado 2011 Ago. 30; Consulta 2016 Ago. 28]. Disponible en: <http://www.ispch.cl/content/15049>
23. Prats G. Microbiología Clínica. España: Medica Panamericana; 2007.
24. García MD, Uruburu F. Colección española de cultivos. La conservación de cepas microbianas. Bogotá Colombia: Universitat de València; 2000.
25. Castro G, Hernández JT, Aquino C. Manual sobre conservación de microorganismos. México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2000.
26. Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. Revista Argentina de Microbiología. 1998; 30:42-51.
27. Watson JD, Tooze J, Kurtz DT. ADN Recombinante. Introducción a la ingeniería genética. Barcelona: Editorial Labor; 1986.
28. Rehm HJ, Reed G. Biotechnology microbial fundamentals. Vol.1. Alemania: Editorial Verlag Chemie; 1981.
29. Snell JJS, Kirsop BE, Doyle A. General introduction to maintenance methods. Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods. London: Academic Press; 1991:21-30.
30. Hawksworth DL, Sastramihardja I, Kokke R, Stevenson R. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. World Federation of Culture Collection Standard Committee. UK: Simwoth Press. 1999:24.
31. Koneman E, Roberts G. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas en color. 6a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2012.
32. Tortora GJ, Funke VR, Case CL. Introducción a la microbiología 9a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.
33. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Curso Teórico-Práctico de Postgrado. Preservación de cultivos en Microbiología Clínica. La Pampa

- Buenos Aires: Departamento de Química Biológica y de Ciencias Biológicas. UBA; 2002.
34. World Federation for Culture Collections. Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos" [en línea] [Actualización 2016; Consulta 19 de mayo de 2017]. Disponible en: http://www.wfcc.info/pdf/Guia_WFCC_espa_ol.pdf.
 35. Biomerieux. Medios cromogénicos: Medio chromID CPS [internet]. c2016 [Actualizado 2016 Sep 02; consulta 2017 Abr. 25]. Disponible en: http://www.biomerieux.com.co/servlet/srt/bio/colombia/dynPage?open=CLM_CLN_PRD&doc=CLM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_41&pubparams.sform=2&lang=es_co
 36. Biomerieux. Medios cromogénicos: Aislamiento de colonias Salmonella Elite [internet]. c2016 [Actualizado 2016 Jun 14; consulta 2017 May. 07]. Disponible en: <http://www.biomerieux.com/en/biomerieux-launches-chromidr-salmonella-elite-new-generation-culture-media-earlier-detection>.
 37. Britanialab. EMB agar [internet]. No date [consulta 2017 May. 07]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/embagar.htm>
 38. Britanialab. BHI [internet]. No date [consulta 2017 May. 07]. Disponible en: <http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/cerebcorinfusagar.htm>
 39. Britanialab. Citrato de Simmons [internet]. No date [consulta 2017 May. 07]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/simmonscitagar.htm>
 40. Britanialab. Medio MIO [internet]. No date [consulta 2017 May. 08]. Disponible en: <http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/miomedio.htm>
 41. Britanialab. Lisinahierro agar [internet]. No date [consulta 2017 May. 08]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/lisinahierroagar.htm>
 42. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª Ed. Buenos Aires: Editorial médica panamericana; 2004.
 43. Britanialab. MR-VP [internet]. No date [consulta 2017 May. 11]. Disponible en: <http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/mr-vpmedio.htm>
 44. Cuenta en placa de bacterias [internet]. No date [consulta 2017 May. 11]. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf
 45. Britanialab. Kligler hierro agar [internet]. No date [consulta 2017 May. 11]. Disponible en: <http://britanialab.com.ar/esp/productos/b02/kliglerhierroagar.htm>
 46. García López Edgar, Implementación de un método de conservación de cepas bacterianas, FES Zaragoza Campus II, Tesis de Licenciatura, 2013.
 47. Britanialab. Agar Salmonella-Shigella [internet]. No date [consulta 2017 Jun. 08]. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/salmoshigagar.htm>

Imágenes

1. Fisión Binaria, Department of Microbiology, Collage of agricultura of life sciences [Internet]. No date [consulta 2017 Ene. 16]. Disponible en: <https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/espanol/fisi%C3%B3n-binaria-e-otras-formas-de-reproduc%C3%ADon-en-bacteria>
2. Medios de cultivo, Ztlab. [Internet]. No date [consulta 2017 May. 02]. Disponible en: <http://ztlab.com.ar/author/admin/>
3. Tinción de gram, Medical Laboratoris Portal [Internet]. No date [consulta 2017 Feb. 21]. Disponible en: <http://www.medical-labs.net/gram-staining-1099/>
4. Rutas fermentativas de la glucosa [Internet]. No date [consulta 2017 Feb. 21]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/nataliaizurieta/laboratorio-no-5-pruebas-bioquimicas-8146300>
5. Klebsiella pneumoniae observada en un microscopio de contraste [Internet]. No date [consulta 2017 Dic. 01]. Disponible en: http://microbitosblog.com/2015/04/20/klebsiella_medio_cultivo_infeccion_gram/
6. Estructura general de un Enterobacteria [Internet]. No date [consulta 2017 Sep. 11]. Disponible en: <http://www.universocanario.com/salud/tecnologia/resistencia-antibioticos/enterobacterias/333300>
7. Tinción de Gram de la bacteria *Serratia marcescens* a 2µm [Internet]. No date [consulta 2017 Nov. 07]. Disponible en: <https://fineartamerica.com/featured/1-serratia-marcescens-bacteria-sem-sciemat.html>
8. Célula de Bacteria *Escherichia coli* [Internet]. No date [consulta 2017 Mar. 16]. Disponible en: <https://www.youbioit.com/es/article/9846/celula-de-bacteria-escherichia-coli>
9. Cromo agar CPS Biomeriux [Internet]. No date [consulta 2017 Nov. 16]. Disponible en: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/9-chromid-cps-elite>
10. Cromo agar *Salomnella* elite con *Salmonella enteritidis* inoculada Biomeriux [Internet]. No date [consulta 2017 Nov. 16]. Disponible en: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/14-chromid-salmonella-elite>
11. Agar *Salmonella-Shigella* con *Salmonella enteritidis* inoculada Biomeriux [Internet]. No date [consulta 2017 Nov. 16]. Disponible en: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/48-ss-agar>
12. Agar EMB con *Escherichia coli* inoculada [Internet]. No date [consulta 2017 Nov. 16]. Disponible en: https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/EMB-agar,MDA_CHEM-101347?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.mx%2F
13. Agar BHI con pigmentos de prodigiosina [Internet]. No date [consulta 2017 Nov. 16]. Disponible en:

- <http://especialistarepremed.blogspot.mx/2011/11/sintesis-de-prodigiosina-por-serratia.html>
14. Prueba Bioquímica Citrato de Simmons [Internet]. No date [consulta 2017 Ago. 29]. Disponible en: <http://danielmena25.blogspot.mx/>
 15. Reacción de formación de Indol a partir de triptófano [Internet]. No date [consulta 2017 Sep. 12]. Disponible en: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Indole_gl.png
 16. Prueba Bioquímica LIA [Internet]. No date [consulta 2017 Sep. 12]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/ThelmaCorrea/preparacion-de-medios-de-cultivo-para-bioquimicas>
 17. Prueba Bioquímica KIA [Internet]. No date [consulta 2017 Nov. 09]. Disponible en: http://bagginis.blogspot.mx/2016/08/nueva-guia-practica-del-laboratorio_25.html
 18. Prueba Bioquímica Rojo de Metilo [Internet]. No date [consulta 2017 Nov. 09]. Disponible en: http://www.hangangmedia.com/main/gmb_sub.php?page_no=11
 19. Prueba Bioquímica Voges-Proskauer [Internet]. No date [consulta 2017 Nov. 09]. Disponible en: http://bagginis.blogspot.mx/2016/08/nueva-guia-practica-del-laboratorio_25.html
 20. Técnica de vertido en placa [Internet]. No date [consulta 2017 Nov. 09]. Disponible en: http://bagginis.blogspot.mx/2016/08/nueva-guia-practica-del-laboratorio_25.html
 21. Equipo de identificación bacteriana automatizado VITEK2 [Internet]. No date [consulta 2017 Dic 07]. Disponible en: <http://www.prohealthmd.com/laboratory/vitek-2/>