



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Bacterias presentes en *Ulomoides dermestoides*
(Chevrolat, 1878) (Coleoptera: Tenebrionidae).**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

PÉREZ ARTEAGA EDUARDO



DIRECTORA DE TESIS:
Dra. María Margarita Canales Martínez
Los Reyes Iztacala, Estado de México. 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.

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por la Doctora María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por los Sigüientes Miembros del Jurado:

Dra. María Margarita Canales Martínez.

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Mtra. Karla Stephanie Martínez Elizalde

Mtro. Luis Barbo Hernández Portilla

Para la realización de esta Tesis se contó con el apoyo de:

Financiamiento: UNAM PAPIIT IN 212317

**“En algún lugar, alguna
cosa increíble aguarda a ser
descubierta”**

–Carl Sagan

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Margarita Canales, mi directora de tesis, por recibirme en el laboratorio de Farmacognosia y por todo el apoyo brindado durante la realización de este proyecto, por enseñarme las bases del conocimiento que hoy poseo desde que fui su alumno en la carrera, por tenerme toda la paciencia del mundo y por ser un modelo a seguir en mi carrera académica, le estoy totalmente agradecido y siempre tendrá un lugar especial en mi vida.

Al Doctor Marco Aurelio Rodríguez, por toda la ayuda brindada, por las correcciones y consejos, y por demostrarme la amistad que puede existir entre un profesor y un alumno.

A la Doctora Ana Hernández, por guiarme e instruirme a lo largo de la realización de este proyecto, y desde mi llegada al laboratorio de Farmacognosia, este proceso no habría sido el mismo sin su compañía, sin su guía y sin las risas compartidas.

A la Maestra Karla Martínez, por todas las enseñanzas que me proporcionó a lo largo de la carrera, así como por su valioso apoyo y paciencia durante la realización del proyecto, cada consejo fue de gran ayuda para su conclusión, le estoy enormemente agradecido y siempre estará en mi memoria.

Al Maestro Luis Barbo por tomarse el tiempo y dedicación necesarios para aportar a este proyecto, cada aportación fue enriquecedora y de gran ayuda.

A mis compañeros del equipo de trabajo del laboratorio de Farmacognosia: Juan Pablo, Uriel, Hatziri, Brenda, Maricela, Lucero, Yatziry, y Samara, cada plática, cada consejo, cada risa fue de gran apoyo para mí, forman gran parte de este proceso que atravesé, y me alegra mucho el haberlo compartido con ustedes, gracias.

DEDICATORIAS

Para mis padres, Laura Marisa Arteaga Martínez y Fernando Pérez Vega, me han brindado su total apoyo y dedicación, así como todo su amor y cariño posible desde que llegue a este mundo, mucho más de lo que yo podría llegar a merecer. Todo lo que soy se los debo a ellos, a sus enseñanzas, sus consejos, sus regaños, sus palabras. Cada día me motivan a superarme en todo lo que se pueda, porque veo en ellos modelos a seguir, excelentes personas y maravillosos padres. Este logro es también suyo, los amo eternamente, son los mejores padres que cualquier hijo pudiera tener.

Para mi hermano, Alejandro Pérez Arteaga, porque a pesar de nuestras diferencias, me ha enseñado el fuerte lazo de lealtad, confianza y amor que puede haber entre hermanos, por aconsejarme, por apoyarme y por sacarme risas de las maneras más espontáneas posibles, este logro también es tuyo.

Para mis abuelos, Fernando Pérez y María Luisa Edith Vega, quienes han sido segundos padres para mí, me han dado todo el amor del universo y han contribuido en lo que soy actualmente, los amo.

Para mi abuelita, Yolanda Martínez, la persona más noble y cariñosa que pueda existir, quien siempre ha estado ahí para mí y para toda mi familia, sin importar como se sienta ella, te amo.

A mis tíos, Mónica, Gabriela, Álvaro, Alicia, Emilio, Jorge, y a toda mi familia en general, ustedes han contribuido de alguna manera en lo que soy ahora, gracias por su cariño, consejos y por estar ahí siempre que los necesité.

A Juan Pablo, mi mejor amigo, quien ha estado en todo momento, en las buenas y en las malas, con un consejo o simplemente sacándome una risa, estoy eternamente agradecido de haber compartido este camino contigo, espero sigamos creciendo juntos.

Para Carlos, Héctor y Alex, el mejor equipo de trabajo y amigos que nadie puede tener, fueron parte de este proceso, y me alegra haber compartido con ustedes la carrera, no habría sido lo mismo sin ustedes, gracias por todo.

A Ibran, Pepe, Óscar, Coyote, Mario, y Erick, mejores amistades no puede haber, cada risa, cada plática, cada salida son recuerdos que atesoro en mi memoria, es imposible no pasarla bien con ustedes, gracias por formar parte de este proceso.

A Brenda, Mari, Lucero Yatziry, Samara, Hatziri, Uriel, Tavo, Mario, Alma, Alonso, Pili, Dany, Gus, Ruben y Judith, formaron parte de este proceso e hicieron que mi estancia en el laboratorio fuera una experiencia increíble, espero poder seguir compartiendo anécdotas con ustedes.

A Alín y a Richard, amigos que uno no espera hacer en la carrera pero que ahora no puedes imaginar cómo habría sido esta etapa sin ustedes, los quiero y les agradezco todas sus enseñanzas y consejos, por guiarme y por compartir sus experiencias conmigo.

Para Miss Inna, mi maestra de biología y química de secundaria, quien me inculcó el gusto hacia la ciencia a muy temprana edad a través de la dedicación, pasión y emoción con la que daba sus clases, clases que nunca olvidaré y que forman parte de lo que soy hoy.

Finalmente, dedico este trabajo a aquellos a los que les sea de ayuda este proyecto, que tomen lo necesario para enriquecerse y aprovechar el conocimiento generado de la mejor manera y que, por más difícil de recorrer que sea el camino, nunca se rindan, todo tiene solución con una sonrisa.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	x
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	5
Objetivos Particulares	5
MATERIAL Y MÉTODOS	6
Cultivo de gorgojo.	6
Obtención y determinación de bacterias de epicutícula.	6
Obtención y determinación de bacterias de Tracto digestivo.	8
RESULTADOS	9
□ Epicutícula de la larva.	9
□ Epicutícula de Adulto	15
□ Tracto digestivo de larva.	19
□ Tracto digestivo de adulto.	24
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIÓN	37
LITERATURA CITADA	38
APÉNDICES	43
□ Cultivo de <i>Ulomoides dermestoides</i>	43
□ Extracción de tracto digestivo de larva y adulto de coleóptero por micro disección.	45
□ Agar Müller Hinton	46
□ Agar Dextrosa Papa (PDA)	48
□ Agar con Eosina y Azul de Metileno (EMB)	50
□ Agar MacConkey.	52

□	Agar Estafilococos no.110 (S-110).....	53
□	Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS)	54
□	Agar Ceftrimida.....	56
□	Agar Enterococcosel	58
□	CHROMagar Candida.	60
□	CHROMagar Orientation	61
□	Tinción de Gram.....	63
□	Antibiogramas por difusión en disco.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida larval de <i>U. dermestoides</i>	3
Figura 2. A. Agar M-H con sembrado de bacterias de epicutícula de la larva.	9
Figura 3. Microscopía de cultivo bacteriano en M-H.	10
Figura 4. Agares diferenciales con crecimiento bacteriano	11
Figura 5. Prueba de fermentación de manitol positiva de cultivo de agar S-110 de epicutícula de larva de <i>U. dermestoides</i>	13
Figura 6. CHROM agar Candida con crecimiento de <i>Candida tropicalis</i>	13
Figura 7 Agares diferenciales de cultivos bacterianos de epicutícula de adulto de <i>U.</i> <i>dermestoides</i>	15
Figura 8. Prueba de fermentación de manitol de bacterias crecidas agar S-110 de epicutícula de adulto.	18
Figura 9. Agares diferenciales de cultivos bacterianos de tracto digestivo de larva de <i>U.</i> <i>dermestoides</i>	20
Figura 10. Crecimiento bacteriano en CHROMagar Orientation.....	21
Figura 11. Prueba de fermentación de Manitol de bacterias crecidas agar S-110 de Tracto digestivo de larva de <i>U. dermestoides</i>	23
Figura 12. Agares diferenciales de cultivos bacterianos de tracto digestivo de adulto de <i>U.</i> <i>dermestoides</i>	25
Figura 13. Crecimiento bacteriano en CHROMagar Orientation	26
Figura 14. Prueba de fermentación de Manitol de las colonias crecidas en agar S-110 de tracto digestivo de adulto de <i>U. dermestoides</i>	28
Figura 15. <i>U. dermestoides</i> en etapa adulta..	43
Figura 16. Extracción de tracto digestivo de Adulto de <i>U. dermestoides</i>	45
Figura 17 Bacterias Gram negativas.....	65
Figura 18 Bacterias Gram positivas	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Agares diferenciales a emplear.	7
Cuadro 2. Morfología colonial de bacterias presentes en Agar M-H.	9
Cuadro 3. Crecimiento en Agar diferencial de colonias bacterianas.	10
Cuadro 4. Halos de inhibición en mm. de antibiogramas presentes.....	12
Cuadro 5. Bacterias identificadas de epicutícula de la larva <i>U. dermestoides</i>	14
Cuadro 6. Agares diferenciales empleados en donde hubo crecimiento bacteriano.	15
Cuadro 7. Halos de inhibición en mm de los antibiogramas realizados.....	17
Cuadro 8. Bacterias identificadas de epicutícula de adulto <i>U. dermestoides</i>	18
Cuadro 9. Agares diferenciales empleados en donde hubo crecimiento bacteriano de tracto digestivo de larva de <i>U. dermestoides</i>	19
Cuadro 10. Halos de inhibición en mm de los antibiogramas realizados.....	22
Cuadro 11. Bacterias identificadas en tracto digestivo de la larva <i>U. dermestoides</i>	23
Cuadro 12. Agares diferenciales empleados en donde hubo crecimiento bacteriano.	24
Cuadro 13. Halos de inhibición en mm de los antibiogramas realizados.....	27
Cuadro 14. Bacterias identificadas en tracto digestivo del adulto <i>U. dermestoides</i>	29
Cuadro 15. Taxonomía de <i>U. dermestoides</i>	43
Cuadro 16. Composición de Agar Müeller Hinton por litro de agua destilada.	46
Cuadro 17. Composición de Agar PDA por litro de agua destilada.	48
Cuadro 18. Composición de Agar EMB por litro de agua destilada.	50
Cuadro 19. Composición de Agar Mac Conkey por litro de agua destilada.	52
Cuadro 20. Composición de Agar S-110 por litro de agua destilada.	53
Cuadro 21. Composición de Agar TCBS por litro de agua destilada.	54
Cuadro 22. Composición de Agar Cetrimida por litro de agua destilada.....	56
Cuadro 23. Composición de Agar Enterococcosel por litro de agua destilada.	58
Cuadro 24. Composición de CHROMAgar Candida por litro de agua destilada.....	60
Cuadro 25. Composición de CHROMAgar Orientation por litro de agua destilada.	62
Cuadro 26. Interpretación de resultados en CHROMAgar Orientation.	62

RESUMEN

Dentro de la medicina tradicional, la coleopteroterapia se ha usado para tratar diferentes padecimientos. Ésta consiste en la ingesta de escarabajos con propiedades medicinales, dentro de los cuales se encuentra *U. dermestoides*, comúnmente llamado gorgojo chino. Se tienen antecedentes donde se reporta su capacidad antiinflamatoria, antioxidante y antiproliferativa, sin embargo no se tiene reportes de bacterias presentes en alguna de las etapas del ciclo de vida de este coleóptero. Por lo que el objetivo fue determinar el tipo de bacterias presentes en la larva y adulto de *U. dermestoides*. Se aislaron bacterias de la epicutícula y tracto digestivo de 10 larvas y adultos, estas bacterias se cultivaron en agares Müeller-Hinton y Papa-Dextrosa, para posteriormente realizar cultivos en agares diferenciales para su determinación, de igual manera se realizó la tinción de Gram de un frotis de cada uno de los cultivos bacterianos para observar la morfología microscópica. Se determinó que la epicutícula de la larva y el adulto presenta bacterias como *Klebsiella spp.* y *Enterococcus spp.*, así como la especie *Staphylococcus aureus*. Mientras que para el caso del tracto digestivo se determinó la presencia de *Klebsiella spp.*, *Enterococcus spp.* y *Staphylococcus aureus*, así como *Pseudomonas spp.*, en los organismos adultos. Estas bacterias a su vez presentaron resistencia frente a antibióticos β -Lactámicos.

PALABRAS CLAVE: Coleopteroterapia, *Ulomoides dermestoides*, Bacterias, Larva, Tracto digestivo, Epicutícula.

INTRODUCCIÓN

El orden Coleoptera es uno de los grupos taxonómicos más diversos, teniendo registradas a nivel mundial, aproximadamente 387,100 especies de coleópteros clasificados en 211 familias (Bouchard et al., 2011). Sin embargo el 68% de las especies descritas se agrupa en 8 familias taxonómicas, dentro de las cuales destaca la familia Tenebrionidae (Deloya y Saavedra, 2016). Las especies de esta familia son reconocibles por presentar coloraciones de tonos marrones a negro y alimentarse principalmente de harinas.

Algunas especies de la familia Tenebrionidae, son usadas en actividades humanas, desde su aplicación para fines didácticos (Mondragón y Contreras, 2015) hasta ser alimento para animales de granja o mascotas (Finke y Winn, 2004). Dentro de una de estas aplicaciones se encuentra su uso en la coleopteroterapia en la medicina tradicional, la cual consiste en la ingesta de *Ulomoides dermestoides* con fines terapéuticos para tratar los síntomas de una amplia gama de enfermedades como asma, artritis, cáncer, diabetes, enfermedad de Parkinson, impotencia, problemas oculares, psoriasis, quistes de ovario, reuma y VIH-SIDA, entre otras (Kriton, 2008).

Para el tratamiento de enfermedades, las personas llegan a consumir 4900 escarabajos vivos en 140 días; comenzando con la ingesta de uno el primer día, hasta llegar a consumir 70 en un solo día; posterior a esto, la ingesta va disminuyendo hasta llegar a consumir uno al día. Los pacientes que utilizan la coleopteroterapia, lo han hecho con base al conocimiento empírico, por esta razón el escarabajo ha sido estudiado y a la fecha existen muchos testimonios de personas que lo han consumido y que han manifestado mejoría en los síntomas que ocasionan sus padecimientos (Cupul-Magaña, 2010).

Ulomoides dermestoides, mejor conocido como “gorgojo chino”, es una especie proveniente de China (Cupul-Magaña, 2010), sin embargo actualmente se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo. Fue introducido en América

Latina con el fin de utilizarlo en campañas para el tratamiento de pacientes con problemas asmáticos (Castelli, 2005).

Las hembras de *U. dermestoides* ovipositan grupos reducidos de entre 3 a 9 huevos, pero cada uno de ellos es fácilmente observable. Su coloración inicial es clara, y luego de apariencia translúcida. El promedio de incubación de las posturas es de 16.4 días, con un rango de 16 a 18 días. Al eclosionar los huevos emergen larvas de gran movilidad, presentan coloración blanco-cremosa uniforme, variando en tamaño desde 1 mm a 11 mm. Son típicas elateriformes, presentando su cuerpo visiblemente segmentado y viven en este estado aproximadamente 55 días (promedio) con un rango de 52 a 57 días, pasando por 11 estadios larvales, observables debido al número de ecdisis por las que éstas realizan (Garcés et al., 2009). Posteriormente entra en fase de pupa, en la que dura de 5 a 6 días, de donde sale un juvenil de color blanco, que se torna de color marrón y luego negro cuando alcanza la madurez (Castelli, 2005) (Figura 1).

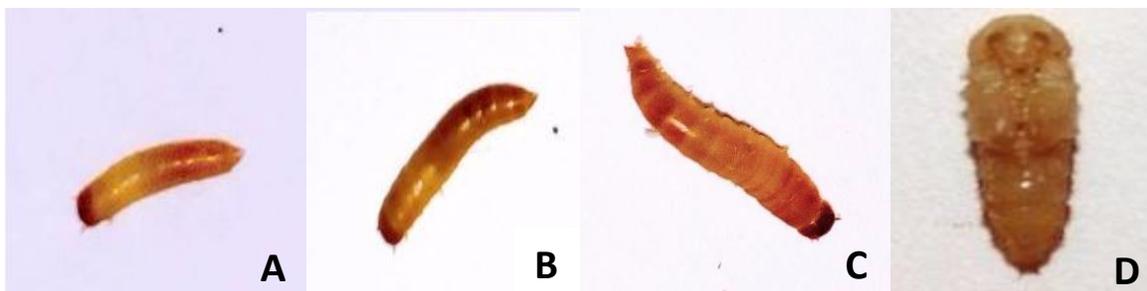


Figura 1. Ciclo de vida larval de *U. dermestoides*, A: larva estadio 1; B: larva estadio 5; C: larva estadio 11; D: pupa (Fotos originales de Pérez- Arteaga, 2018).

Se ha demostrado la presencia de bacterias en ejemplares adultos de *U. dermestoides*, pertenecientes al grupo de enterobacterias, tales como: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae* y *Pantoea agglomerans* (Medina et al., 2015). Estas bacterias han sido reportadas como patógenas para el humano, de las cuales destacan *Klebsiella pneumoniae*, ya que puede originar una forma grave de neumonía (Tortora et al., 2007) y *Escherichia coli* de la cual una de sus cepas

puede ocasionar fiebre, calambres abdominales y colitis hemorrágica en peores casos, así como ser una de las bacterias con mayor facilidad de infección, principalmente por medio de alimentos contaminados (OMS, 2018).

El tracto digestivo de insectos es un hábitat distintivo para la colonización microbiana y las comunidades bacterianas pueden ser las causantes de procesos benéficos para sus huéspedes, ya sea en insectos adultos o en larvas de los mismos (Jung et al., 2014).

Galvis et al. (2009), hallaron la presencia de bacterias en el tracto digestivo de larvas de coleóptero de la familia Scarabeide, dentro de las cuales destacan cocos y diplococos.

Por otra parte, Genta et al. (2006), analizaron la microbiota del tracto digestivo de larvas de *T. molitor*, donde se especula que bacterias, levaduras y hongos ayudan durante el proceso de digestión, así como a la detoxificación de algunos metabolitos secundarios, o bien, para acoplarlos al organismo como un posible mecanismo de defensa.

A pesar de que se ha comprobado la presencia de bacterias en coleópteros adultos y larvas, con respecto a la larva de *U. dermestoides* existe muy poca literatura al respecto, ya que la mayoría de estudios enfocados a éste, son relacionados directamente con las propiedades medicinales de los adultos, al igual que los estudios relacionados con larvas de coleópteros son dirigidos mayoritariamente a las de *T. molitor*, debido a su importancia comercial (Mondragón y Contreras, 2015).

Por lo tanto el determinar las bacterias presentes en tracto digestivo y epicutícula de la larva y adulto de *U. dermestoides*, genera las bases para futuras investigaciones acerca de las micro comunidades bacterianas presentes en estos organismos, las posibles relaciones que entre éstos y posibles aplicaciones biotecnológicas o de entomología médica.

OBJETIVO GENERAL

Determinar y comparar los tipos de bacterias presentes en epicutícula y tracto digestivo en larvas y adultos de *Ulomoides dermestoides*.

Objetivos Particulares

1. Obtener las bacterias de la epicutícula de larvas y adultos de *U. dermestoides*.
2. Determinar las bacterias obtenidas a nivel de género de la epicutícula de la larva y del adulto de *U.dermestoides*
3. Obtener las bacterias presentes en el tracto digestivo de la larva y adulto de *U. dermestoides*.
4. Determinar las bacterias obtenidas a género del tracto digestivo de la larva y adulto de *U. dermestoides*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de gorgojo.

Los ejemplares de *U. dermestoides* (Apéndice 1, Cuadro 15) fueron adquiridos por medio de un productor particular, e identificados por medio de la Colección de Artrópodos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (CAFESI). Se mantuvieron en un recipiente de plástico rectangular, con una cama de aserrín con avena. Fueron alimentados con pan de caja integral y cáscara de plátano y mantenidos en obscuridad (Apéndice 1). Para la extracción de bacterias se usaron larvas en estadio 11 de desarrollo y adultos maduros.

Obtención y determinación de bacterias de epicutícula.

➤ Larva y Adulto

Se tomaron 10 larvas en estadio 11 ó 10 adultos, según haya sido el caso. Se sacrificaron los organismos (larvas o adultos) en congelación durante 5 minutos y posteriormente se colocaron en tubos estériles con 10 mL de solución salina (NaCl al 0.9%) y se agitaron en vórtex sin dañar la integridad del organismo. Después, se realizaron 2 diluciones de 100 μ L en 10 mL respectivamente; de cada dilución se tomaron 50 μ L y se sembraron en placas septadas de Agar Papa Dextrosa (PDA) y agar Mueller-Hinton (M-H) y se incubaron por 24 h a 37°C (Quiroz, 2005; Galvis et al., 2009). Posteriormente, se realizaron cultivos de cada colonia bacteriana en agares diferenciales (Cuadro 1) para determinar el género de bacterias y levaduras presentes en la epicutícula.

Cuadro. 1 Agares diferenciales a emplear (Cultimed, 2003).

AGAR	INDICADOR	RESULTADOS
EMB (Apéndice 5)	Eosina y Azul de Metileno	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E.coli</i>: Colonias grandes, color negro azulado, brillo verde metálico • <i>Enterobacter/Klebsiella</i>: Colonias grandes, mucoides, color negro azulado • <i>Salmonella/Shigella</i>: Colonias grandes, desde incoloras hasta color ámbar
TCBS (Apéndice 8)	Citrato Férrico, Azul de Bromotimol y Azul de Timol	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Vibrio fermentadores de sacarosa</i>: Colonias pequeñas, color amarillo con halos amarillos. • Bacterias no fermentadoras de sacarosa: Colonias pequeñas, opacas del color del medio.
Mac Conkey (Apéndice 6)	Rojo Neutro, Sales biliares y Cristal violeta	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E.coli</i>: colonias rosa, con precipitado biliar. • <i>Enterobacter aerogenes</i>: Colonias pequeñas de rosa-rojo. • <i>Klebsiella</i>: Colonias mucoides, grandes, rosadas • <i>Proteus/Salmonella</i>: Colonias incoloras y transparentes
Enterococcosel (Apéndice 10)	Citrato férrico y esculina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus/Streptococcus bovis</i>: Colonias pequeñas, translúcidas, con zonas de color negro. • <i>Staphylococcus</i>: Colonias grandes, blancas, opacas. • <i>Corinebacterium</i>: Pequeños a grandes, color blanco a amarillo grisáceo, lisos e irregulares.
S-110 (Apéndice 7)	Lactosa y Manitol	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i>: Colonias pequeñas redondas de color "dorado". • <i>Staphylococcus spp.</i> : Colonias redondas pequeñas coloración blanquecina.
Cetrimida (Apéndice 9)	Cloruro de magnesio	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: Crecimiento con pigmento verde azulado alrededor de las colonias; fluorescencia bajo luz UV. • <i>Pseudomonas spp.</i> : Crecimiento sin pigmento.
CHROMagar Candida. (Apéndice 11)	Mezcla cromógena	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans</i>: Colonias de color verde claro a mediano • <i>Candida krusei</i>: Colonias planas, de color de rosa claro a rosa, con un borde blancuzco • <i>Candida tropicalis</i>: Colonias de azul grisáceo a azul verdoso o azul metálico

Se incubaron por 24 horas a 37°C. Una vez transcurridas las 24 horas se observó la morfología colonial y se realizó tinción de Gram para su observación en microscopio y determinar si son Gram (+) o Gram (-) y la morfología microscópica (Olmos et al., 2010). Por último se realizaron antibiogramas con multidiscos Gram positivos y negativos para cada cultivo bacteriano de los agares diferenciales, para determinar sensibilidad frente a antibióticos ya establecidos (Apéndice 14).

Obtención y determinación de bacterias de Tracto digestivo.

➤ Larva y Adulto

Se tomaron 10 larvas en estadio 11 ó 10 adultos según haya sido el caso. Se sacrificaron los organismos (larvas o adultos) por enfriamiento, colocadas durante cinco minutos en congelación a -18°C, antes de ser utilizadas. Los especímenes ya sacrificados fueron sometidos a desinfección de la superficie sumergiéndolos en etanol 95% durante 2 minutos y después en solución salina al 0.9% (Suh et al., 2003). Posteriormente se realizó la extracción del tubo digestivo por medio de disección (Apéndice 2) (Vasanthakumar et al., 2008), los cual fueron introducidos en un micro tubo (Eppendorf) con 2 mL de solución salina estéril al 0.9% y se agitaron en el vórtex por 30 segundos para separar los microorganismos de las paredes del tejido. Luego 50 µL de la muestra fueron inoculados en placas de Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar Müeller Hinton y se incubó por 24 horas a 37°C. (Quiroz, 2005; Galvis et al., 2009). Posteriormente, se realizaron cultivos de las colonias bacterianas en agares diferenciales para determinar el género de bacterias y levaduras presentes (Cuadro 1). Adicionalmente, las colonias crecidas en agar EMB y MacConkey fueron sembradas en CHROMagar Orientación (Apéndice 13).

Se incubaron por 24 horas a 37°C. Una vez transcurridas las 24 horas se observó la morfología colonial y se realizó tinción de Gram para su observación en microscopio y determinar si son Gram (+) o Gram (-) y la morfología microscópica (Olmos et al., 2010). Por último, se realizaron antibiogramas con multidiscos Gram positivos y Gram negativos para cada cultivo bacteriano de los agares

diferenciales, para determinar sensibilidad frente a antibióticos ya establecidos (Apéndice 14).

RESULTADOS

➤ Epicutícula de la larva.

En el cuadro 2, se muestra la descripción de la morfología colonial presente en el medio Müeller-Hinton, tras haber inoculado 50 µL de solución homogénea de larvas de *U. dermestoides*, como se ve en la figura 2. Se distinguen 3 colonias con morfología distinta así como la presencia de hifas como se observa en la figura 3.

Cuadro 2. Morfología colonial de bacterias presentes en Agar M-H.

Colonia	Morfología
1	Colonia con bordes irregulares, consistencia lechosa, margen curvado, coloración marrón.
2	Colonias de tamaño grande, de forma circular
3	Colonias de tamaño pequeño de forma circular.
Hifas	Presencia de hifas

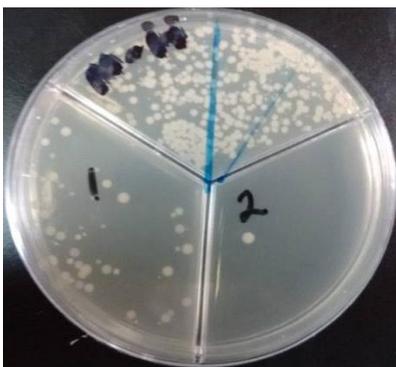


Figura 2. A. Agar M-H con sembrado de bacterias de epicutícula de la larva.

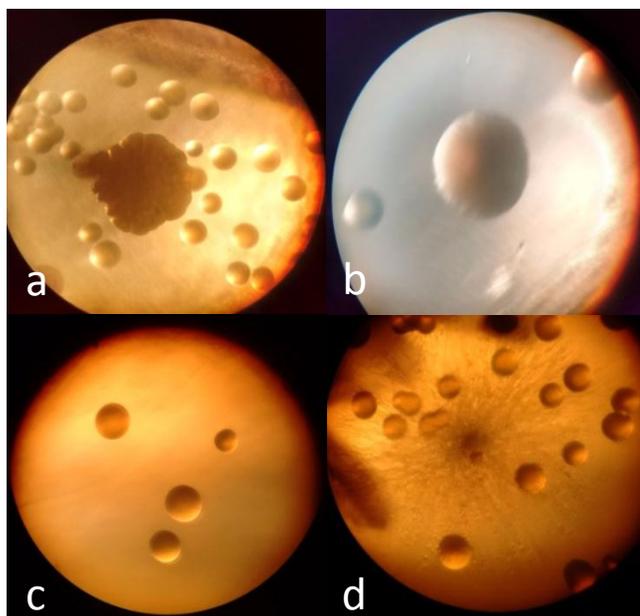


Figura 3. Microscopía de cultivo bacteriano en M-H, a, b y c corresponden a morfologías coloniales bacterianas distintas, d es crecimiento de hifas.

En el cuadro 3, se presenta los agares diferenciales empleados donde hubo crecimiento bacteriano tras haber sembrado las 3 colonias diferentes en cada agar. Destaca que en medio TCBS no hubo crecimiento de ninguna colonia, mientras en agar Enterococcosel y EMB las 3 colonias presentaron crecimiento.

Cuadro 3. Crecimiento en Agar diferencial de colonias bacterianas.

Agar Diferencial	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3
MacConkey	SC	X	X
S-110	X	SC	SC
TCBS	SC	SC	SC
Cetrimida	SC	SC	SC
Enterococcosel	X	X	X
EMB	X	X	X

Se señala en donde hubo crecimiento con X. SC: sin crecimiento.

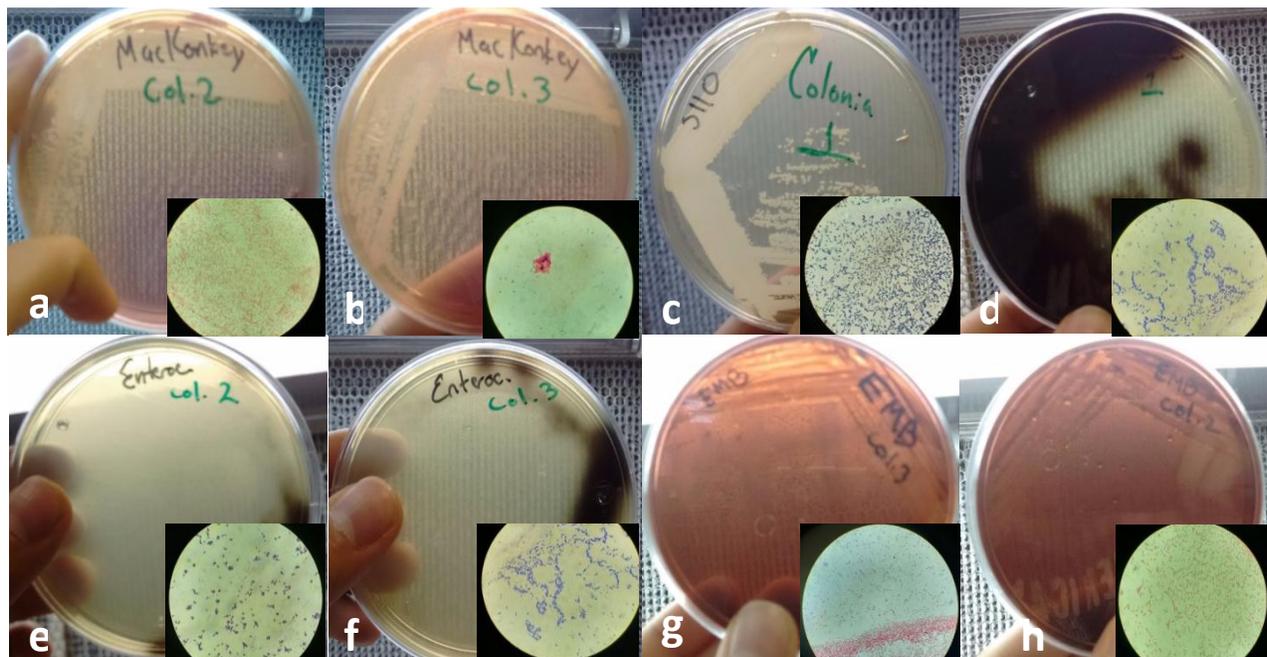


Figura 4. Agares diferenciales con crecimiento bacteriano: a. Col.2 Maconkey, b. Col. 3 Maconkey, c. Col. 1 S-110, d. Col. 1 Enterococcosel, e. Col. 2 Enterococcosel, f. Col. 3 Enterococcosel, g. Col. 2 EMB, h. Col. 3 EMB.

En la figura 4 se observa el crecimiento bacteriano en los agares diferenciales, se notan las diferentes morfologías coloniales, así como el cambio de color en el agar Enterococcosel y una coloración morada en MacConkey y EMB. A su vez se observa morfología microscópica de las bacterias después de tinción de Gram, donde se determinó que las colonias 1, 2, y 3 del Agar Enterococcosel son streptococos Gram Positivos, estafilococos Gram Positivos en el Agar S-110 para la colonia 1 y Bacilos Gram Negativos para las Colonias 1 y 2 en los Agares MacConkey y EMB.

En el cuadro 4 se aprecian los halos de inhibición de los antibiogramas para Gram (+) y Gram (-) realizados a cada cultivo bacteriano Para los antibiogramas G(+) los antibióticos Ampicilina (AM), Erytromicina (E), Cefuroxima (CXM), Penicilina (PE) y Cefalotina (CF) a los que las bacterias presentaron una mayor resistencia y Gentamicina (GE) y Sulfametoxazol (SXT) a los que fueron más sensibles. Para el caso de los antibiogramas Gram (-), los antibióticos Cefalotina (CF) y Ampicilina

(AM) fueron a los que se presentó una mayor resistencia y Sulfametoxazol (SXT) y Levoflaxacina (LEV) los que tuvieron una mayor sensibilidad

Cuadro 4. Halos de inhibición en mm. de antibiogramas presentes

Antib.	Colonia 1		Colonia 2			Colonia 3		
	S-110	Enterocc.	EMB	Macck	Enterocc	EMB	Macck	Enterocc
PE	0 ⁺							
DC	0 ⁺							
PEF	20 ⁺⁺	16 ⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	14 ⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	28	17
CXM	0 ⁺							
GE	25 ⁺⁺⁺	0 ⁺	24 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺⁺	0 ⁺	22 ⁺⁺⁺	21 ⁺⁺⁺	0 ⁺
CTX	0 ⁺	0 ⁺	14 ⁺⁺	8 ⁺	0 ⁺	9 ⁺	13 ⁺	0 ⁺
SXT	28 ⁺⁺⁺	0 ⁺	28 ⁺⁺⁺	31 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺	29 ⁺⁺⁺	29 ⁺⁺⁺	0 ⁺
GRAM (+)	TE	18 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺⁺	17 ⁺⁺	21 ⁺⁺⁺	18 ⁺⁺⁺	18 ⁺⁺
	AM	0 ⁺						
	E	0 ⁺	13 ⁺⁺	0 ⁺	0 ⁺	14 ⁺⁺	0 ⁺	15 ⁺⁺
	CAZ	0 ⁺						
	CF	0 ⁺						
	LEV	25 ⁺⁺⁺	18 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	17 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	3 ⁺
	NET	0 ⁺	15 ⁺⁺	14 ⁺⁺	26 ⁺⁺⁺	15 ⁺⁺	25 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺
	FEP	28	0 ⁺	0 ⁺	11 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	1 ⁺
	CF	0 ⁺						
	GE	2 ⁺	0 ⁺	17 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺⁺	0 ⁺	16 ⁺⁺	18 ⁺⁺⁺
	CTX	0 ⁺	0 ⁺	14 ⁺⁺	14 ⁺⁺	0 ⁺	12 ⁺⁺	14 ⁺⁺
GRAM (-)	SXT	27 ⁺⁺⁺	0 ⁺	3 ⁺⁺⁺	3 ⁺⁺⁺	26 ⁺⁺⁺	31 ⁺⁺⁺	27 ⁺⁺⁺
	AK	24 ⁺⁺⁺	0 ⁺	21 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	0 ⁺	21 ⁺⁺⁺	22 ⁺⁺⁺
	AM	0 ⁺						
	CRO	11 ⁺	0 ⁺	27 ⁺⁺⁺	29 ⁺⁺⁺	13 ⁺	25 ⁺⁺⁺	26 ⁺⁺⁺
	CL	21 ⁺⁺⁺	18 ⁺⁺⁺	18 ⁺⁺⁺	21 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺⁺	21 ⁺⁺⁺	19
	NF	18 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺	19

+ Resistente, ++ Intermediamente sensible, +++Sensible de acuerdo al Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS). Lista de antibióticos en apéndice 14.

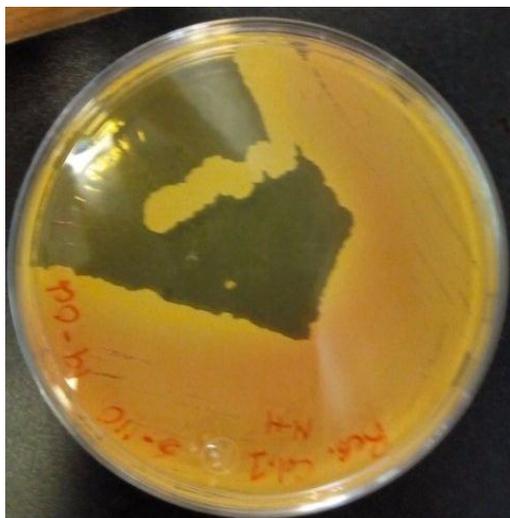


Figura 5. Prueba de fermentación de manitol positiva de cultivo de agar S-110 de epicutícula de larva de *U. dermestoides*

Con respecto a la prueba de fermentación de manitol de las colonias presentes en agar S-110, se obtuvo un resultado positivo, ya que hubo un cambio de color de rojo a amarillo como se observa en la figura 5.

Con respecto a las hifas sembradas en el CHROMagar Candida se obtuvo un crecimiento de colonias de levaduras de un color azul distintivo para *Candida tropicalis*, como se aprecia en la figura 6.



Figura 6. CHROM agar Candida con crecimiento de *Candida tropicalis*.

Con base a los resultados anteriores, se construye el cuadro no. 5, en donde se da la identificación de los microorganismos que constituyen la microbiota de la epicutícula de la larva de *U. dermestoides*, de acuerdo con el agar en donde hubo crecimiento, morfología colonial, morfología microscópica tras la tinción de Gram y prueba de fermentación de manitol en el caso de las bacterias crecidas en el agar S110

Cuadro 5. Bacterias identificadas de epicutícula de la larva *U. dermestoides*.

Agar	Morfología colonial	Morfología microscópica	Fermentación de Manitol	Género o especie
S-110	Color blanquecino textura lisa, redondas.	Estafilococos Gram positivos	Positiva	<i>Staphylococcus aureus</i> .
Enterococcosel	Color blanquecino-transparente, muy pequeñas, cambio de color del agar a negro	Cocos Gram positivos	-	<i>Enterococcus spp.</i>
EMB	Coloración púrpura, consistencia mucosa	Bacilos Gram negativos	-	<i>Klebsiella spp.</i>
MacConkey	Coloración púrpura-rosada, consistencia mucosa, lisa.	Bacilos Gram negativos	-	<i>Klebsiella spp.</i>

(-) No se realizó la prueba.

➤ Epicutícula de Adulto

En el cuadro 6, se presenta en que agares diferenciales empleados hubo crecimiento bacteriano tras haber sembrado las colonias bacterianas presentes en Agar M-H. Destaca que en medio TCBS y Cetrimida no hubo crecimiento de ninguna colonia.

Cuadro 6. Agares diferenciales empleados en donde hubo crecimiento bacteriano.

Agar diferencial	Crecimiento Bacteriano
MacConkey	X
EMB	X
Enterococcosel	X
TCBS	SC
S-110	X
Cetrimida	SC

Se señala en donde hubo crecimiento con X. SC: sin crecimiento.

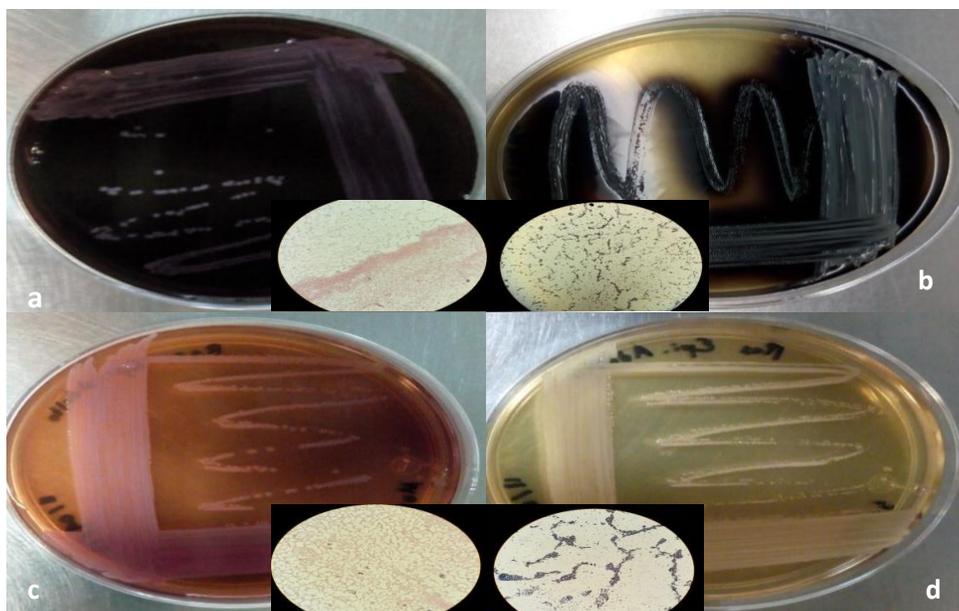


Figura 7 Agares diferenciales de cultivos bacterianos de epicutícula de adulto de *U. dermestoides*, a. EMB, b. Enterococcosel, c. Maconkey, d. S-110.

En la figura 7 se observa el crecimiento bacteriano y morfología colonial en los agares diferenciales. Se presentó una coloración púrpura en el agar EMB, con una textura mucosa similar a las crecientes en el agar MacConkey pero con una coloración rosada-púrpura en éstas últimas. En el agar S-110 la coloración fue blanquecina con una textura lisa, y en el agar Enterococcosel la coloración fue transparente con colonias muy pequeñas de forma circular pero hubo un cambio de coloración en el agar a negro. También se observa la morfología microscópica de las bacterias después de tinción de Gram, se determinó que las colonias que crecieron en agar MacConkey y EMB son bacilos Gram negativos, las presentes en agar Enterococcosel, son streptococos Gram positivos y las que crecieron en S-110 son estafilococos Gram positivos.

En el cuadro 7 se aprecian los halos de inhibición de los antibiogramas para Gram (+) y Gram (-), realizados a cada cultivo bacteriano, siendo los antibióticos Ampicilina (AM), Ceftazimida (CAZ), Cefuroxima (CXM), Penicilina (PE) y Cefalotina (CF) a los que las bacterias presentaron una mayor resistencia y Gentamicina (GE) y Sulfametoxazol (SXT) a los que fueron más sensibles en el caso de los antibiogramas G (+). Para el caso de los Antibiogramas Gram (-), los antibióticos Cefepima (FEP) y Ampicilina (AM) fueron a los que se presentó una mayor resistencia y Sulfametoxazol (SXT), Levoflaxacina (LEV) y Amikacina (AK) los que tuvieron una mayor sensibilidad.

Cuadro 7. Halos de inhibición en mm de los antibiogramas realizados

	Antibiótico	MacConkey	EMB	Enterococcosel	S-110
Gram (+)	PE	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺
	DC	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺
	PEF	28 ⁺⁺⁺	23 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺	12 ⁺
	CXM	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺
	GE	18 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺⁺	25 ⁺⁺⁺	18 ⁺⁺⁺
	CTX	0 ⁺	1 ⁺	0 ⁺	0 ⁺
	SXT	28 ⁺⁺⁺	27 ⁺⁺⁺	26 ⁺⁺⁺	11 ⁺⁺
	TE	0 ⁺	0 ⁺	18 ⁺⁺	20 ⁺⁺⁺
	AM	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺
	E	0 ⁺	0 ⁺	22 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺
	CAZ	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺
	CF	0 ⁺	0 ⁺	11 ⁺	0 ⁺
Gram (-)	LEV	25 ⁺⁺⁺	25 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺
	NET	19 ⁺⁺⁺	18 ⁺⁺⁺	25 ⁺⁺⁺	21 ⁺⁺⁺
	FEP	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺
	CF	0 ⁺	0 ⁺	19 ⁺⁺⁺	0 ⁺
	GE	17 ⁺⁺⁺	17 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺
	CTX	10 ⁺	10 ⁺	0 ⁺	0 ⁺
	SXT	26 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺	26 ⁺⁺⁺	15 ⁺⁺
	AK	21 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺
	AM	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺
	CRO	23 ⁺⁺⁺	23 ⁺⁺⁺	14 ⁺⁺	14 ⁺⁺
	CL	18 ⁺⁺⁺	18 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺⁺
	NF	0 ⁺	0 ⁺	15 ⁺⁺	0 ⁺

+ Resistente, ++ Intermediamente sensible, +++Sensible, de acuerdo al Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS). Lista de antibióticos en apéndice 14.

Con respecto a la prueba de fermentación de manitol de las colonias presentes en agar S-110, se obtuvo un resultado positivo, ya que hubo un cambio de color de rojo a amarillo como se observa en la figura 8.



Figura 8. Prueba de fermentación de manitol de bacterias crecidas agar S-110 de epicutícula de adulto.

Con base en los resultados obtenidos, se realizó el cuadro 8, donde se observa la identificación de las bacterias presentes en la epicutícula del adulto de *U. dermestoides*

Cuadro 8. Bacterias identificadas de epicutícula de adulto *U. dermestoides*.

Agar	Morfología colonial	Morfología microscópica	Fermentación de Manitol	Género o especie
S-110	Color blanquecino textura lisa, redondas.	Estafilococos Gram positivos	Positiva	<i>Staphylococcus aureus</i> .
Enterococcosel	Color blanquecino-transparente, muy pequeñas, cambio de color del agar a negro	Cocos Gram positivos	-	<i>Enterococcus spp.</i>
EMB	Coloración púrpura, consistencia mucosa	Bacilos Gram negativos	-	<i>Klebsiella spp.</i>
MacConkey	Coloración púrpura-rosada, consistencia mucosa, lisa.	Bacilos Gram negativos	-	<i>Klebsiella spp.</i>

(-) No se realizó la prueba.

➤ **Tracto digestivo de larva.**

En el cuadro 9, se presenta en que agares diferenciales empleados hubo crecimiento bacteriano tras haber sembrado las colonias bacterianas presentes en Agar M-H en cada agar diferencial. Únicamente en agar Cetrimida no hubo crecimiento de ninguna colonia.

Cuadro 9. Agares diferenciales empleados en donde hubo crecimiento bacteriano de tracto digestivo de larva de *U. dermestoides*.

Agar diferencial	Crecimiento Bacteriano
MacConkey	X
EMB	X
Enterococcosel	X
TCBS	X
S-110	X
Cetrimida	SC

Se señala en donde hubo crecimiento con X. SC: sin crecimiento.

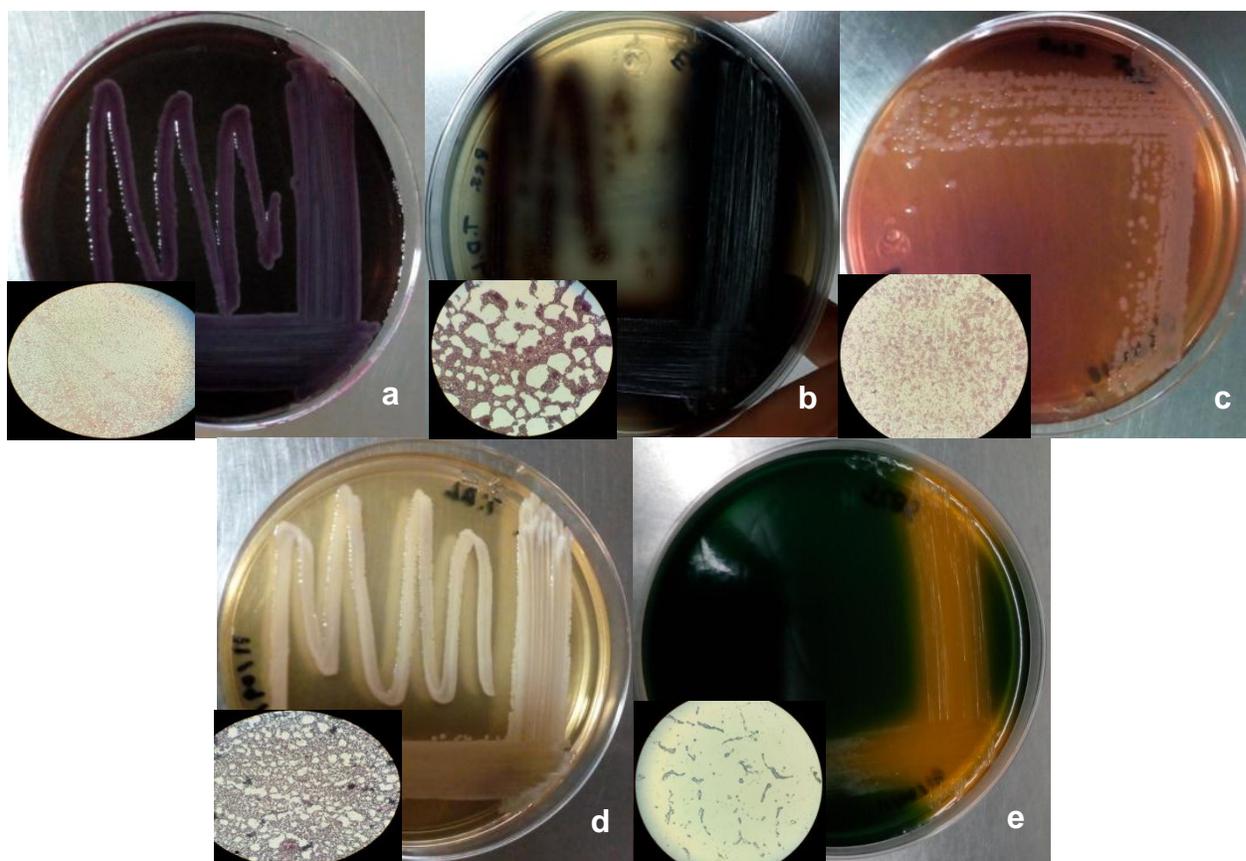


Figura 9. Agares diferenciales de cultivos bacterianos de tracto digestivo de larva de *U. dermestoides*, a. EMB, b. Enterococcosel, c. MacConkey, d. S-110, e. TCBS

En la figura 9 se observa la morfología colonial bacteriana presente en los agares diferenciales empleados. En el agar EMB (a) se presentó una coloración morada, con una consistencia mucosa, en agar Enterococcosel (b) la coloración era blanquecina-transparente, con colonias de un tamaño muy pequeño de forma circular y hubo un cambio en el color del agar a negro, en agar MacConkey (c) la coloración fue de color rosado, con consistencia un poco mucosa similar a la de EMB, en agar S.110 (d) la coloración fue blanquecina con una consistencia seca y en el agar TCBS (e) la coloración fue amarilla al igual que el cambio de color del medio, colonias de tamaño muy pequeño. Así mismo se aprecia la morfología microscópica tras realizar tinción de Gram y se determinó que las colonias que crecieron en agar EMB y MacConkey son bacilos Gram negativos, las

pertenecientes al agar TCBS y Enterococcosel son Streptococos Gram positivos, y las pertenecientes al agar S-110 son Estafilococos Gram positivos.

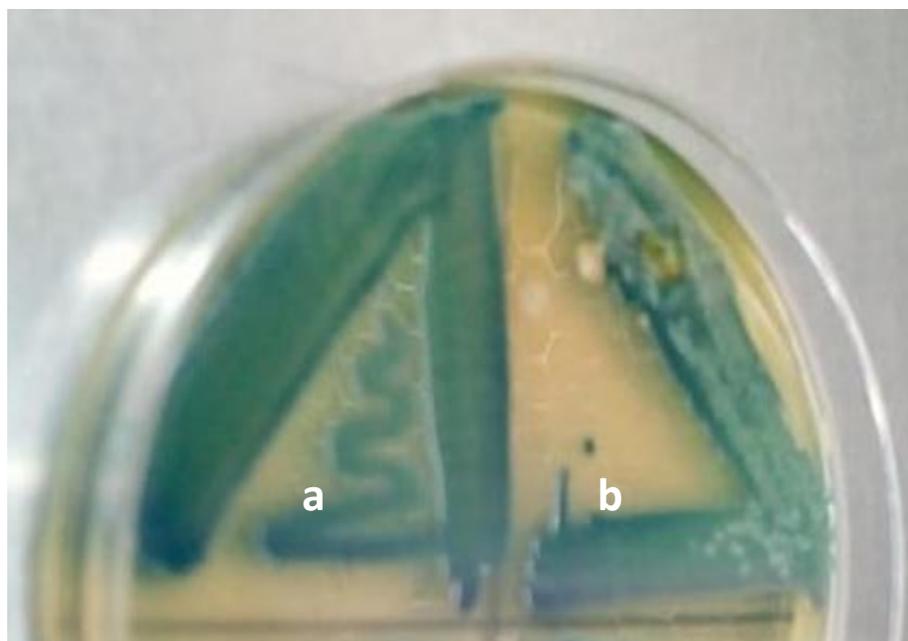


Figura 10. Crecimiento bacteriano en CHROMagar Orientation de colonias tomadas de: a. Agar EMB, b. Agar MacConkey

En la figura 10, se observa el crecimiento bacteriano en el agar cromogénico Orientación, de colonias de bacterias tomadas de los agares EMB y Epicutícula respectivamente. Se puede apreciar que la morfología colonial es la misma en ambos casos, así como el mismo color, indicando que ambos cultivos pertenecen a la misma clase de bacteria. La consistencia y el color del cultivo bacteriano corresponden a *Klebsiella spp.*

En el cuadro 10 se presentan las medidas de los halos de inhibición que se obtuvieron al realizar los antibiogramas Gram negativos y Gram positivos. Resalta que, en el caso de los Gram positivos, los antibióticos a los que se obtuvo mayor resistencia fueron la Cefalotina (CF) y la Ampicilina (AM), y los que presentaron mayor sensibilidad fueron la Gentamicina (GE) y la Ciprofloxacina (CPF). En los antibiogramas Gram negativos, los antibióticos a los que se les presentó mayor resistencia fueron nuevamente Ampicilina (AM) y Cefalotina (CF), mientras los que

presentaron mayor sensibilidad fueron Gentamicina (GE), Ciprofloxacina (CPF) y Norfloxacina (NF).

Cuadro 10. Halos de inhibición en mm de los antibiogramas realizados

	Antibiótico	MacConkey	EMB	Enterococc.	S-110	TCBS
Gram (+)	TE	23 ⁺⁺⁺	15 ⁺⁺	29 ⁺⁺⁺	30 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺
	VA	18 ⁺⁺⁺	0 ⁺	21 ⁺⁺⁺	30 ⁺⁺⁺	18 ⁺⁺⁺
	PE	23 ⁺⁺⁺	0 ⁺	23 ⁺⁺⁺	29 ⁺⁺⁺	17 ⁺⁺
	SXT	13 ⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	0 ⁺	30 ⁺⁺⁺	0 ⁺
	E	12 ⁺	10 ⁺	21 ⁺⁺⁺	14 ⁺⁺	16 ⁺⁺
	GE	24 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	30 ⁺⁺⁺	29 ⁺⁺⁺
	CLM	0 ⁺	0 ⁺	22 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺
	CPF	25 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺
	DC	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	30	0 ⁺
	CFX	30 ⁺⁺⁺	22 ⁺⁺	18 ⁺⁺	26 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺
	CF	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	30 ⁺⁺⁺	0 ⁺
	AM	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	25 ⁺⁺⁺	0 ⁺
Gram (-)	AM	0 ⁺	0 ⁺	10 ⁺	0 ⁺	0 ⁺
	AK	26 ⁺⁺⁺	23 ⁺⁺⁺	25 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	0 ⁺
	CB	11 ⁺	14 ⁺	10 ⁺	11 ⁺	0 ⁺
	GE	28 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	26 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	11 ⁺
	CF	0 ⁺	0 ⁺	28 ⁺⁺⁺	0 ⁺	15 ⁺⁺
	CFX	29 ⁺⁺⁺	26 ⁺⁺⁺	21 ⁺⁺	25 ⁺⁺⁺	0 ⁺
	NET	21 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺⁺	21 ⁺⁺⁺	26 ⁺⁺⁺	10 ⁺
	CPF	25 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	23 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	12 ⁺
	NOF	28 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	17 ⁺⁺⁺	26 ⁺⁺⁺	13 ⁺⁺
	CL	24 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	25 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	18 ⁺⁺⁺
	SXT	28 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	26 ⁺⁺⁺	23 ⁺⁺⁺	0 ⁺
	NF	11 ⁺	11 ⁺	17 ⁺⁺⁺	10 ⁺	19 ⁺⁺⁺

+ Resistente, ++ Intermediamente sensible, +++Sensible de acuerdo al Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS). Lista de antibióticos en apéndice 14.

En la prueba de fermentación de manitol de las colonias presentes en agar S-110, el resultado fue positivo, ya que hubo un cambio de color de rojo a amarillo como se observa en la figura 11.



Figura 11. Prueba de fermentación de Manitol de bacterias crecidas agar S-110 de Tracto digestivo de larva de *U. dermestoides*

Con base en los resultados obtenidos, se realizó el cuadro 11, donde se observa la identificación de las bacterias presentes en el tracto digestivo de la larva de *U. dermestoides*.

Cuadro 11. Bacterias identificadas en tracto digestivo de la larva *U. dermestoides*.

Agar	Morfología colonial	Morfología microscópica	Otras pruebas	Género o especie
S-110	Color blanquecino textura lisa, redondas.	Estafilococos Gram positivos	Fermentación de manitol positiva	<i>Staphylococcus aureus</i> .
Enterococcosel	Color blanquecino-transparente, pequeñas, color del agar negro	Cocos Gram positivos	No se realizó	<i>Enterococcus spp.</i>
EMB	Coloración púrpura, consistencia mucosa	Bacilos Gram negativos	Coloración azul turquesa en CHROMagar	<i>Klebsiella spp.</i>
MacConkey	Coloración púrpura-rosada, consistencia mucosa, lisa.	Bacilos Gram negativos	Coloración azul turquesa en CHROMagar	<i>Klebsiella spp.</i>
TCBS	Coloración amarilla, colonias pequeñas.	Cocos Gram positivos	No se realizó	<i>Enterococcus spp.</i>

➤ **Tracto digestivo de adulto.**

En el cuadro 12, se presentan los agares diferenciales empleados donde se observó crecimiento bacteriano tras haber sembrado las colonias bacterianas presentes en Agar M-H en cada agar diferencial. Destaca que hubo crecimiento en cada uno de los agares empleados.

Cuadro 12. Agares diferenciales empleados en donde hubo crecimiento bacteriano.

Agar diferencial	Crecimiento Bacteriano
MacConkey	X
EMB	X
Enterococcosel	X
TCBS	X
S-110	X
Cetrimida	X

Se señala en donde hubo crecimiento con una X

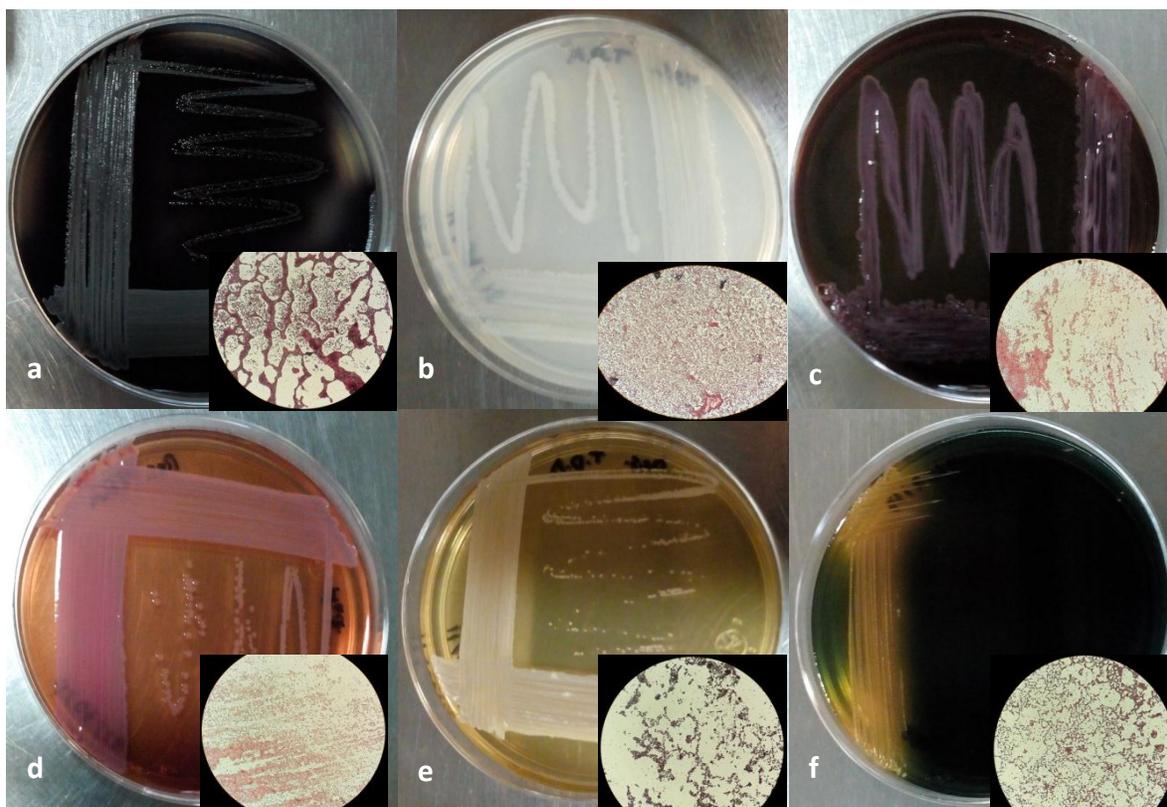


Figura 12. Agares diferenciales de cultivos bacterianos de tracto digestivo de adulto de *U. dermestoides*, a. Enterococcosel, b. Cetrimida c. EMB d. MacConkey, e. S-110, f. TCBS.

En la figura 12 se observa la morfología colonial bacteriana presente en los agares diferenciales empleados, así como la morfología microscópica tras realizar tinción de Gram, y se determinó que las colonias que crecieron en agar EMB, MacConkey y Cetrimida son bacilos Gram negativos, las pertenecientes al agar TCBS y Enterococcosel son Streptococos Gram positivos, y las pertenecientes al agar S-110 son Estafilococos Gram positivos.

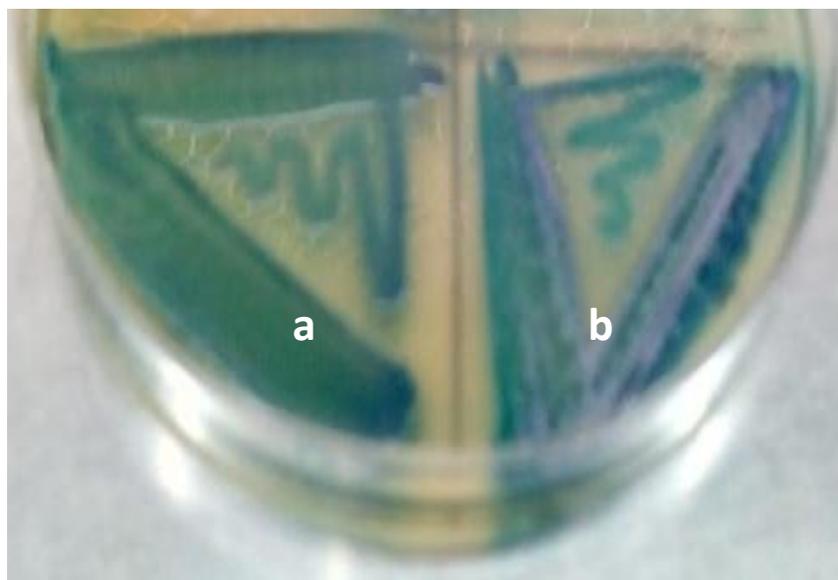


Figura 13. Crecimiento bacteriano en CHROMagar Orientación de colonias tomadas de: A. Agar EMB, B. Agar MacConkey

En la figura 13, se observa el crecimiento bacteriano en el CHROMagar Orientación, de colonias de bacterias tomadas de los cultivos en agares EMB y MacConkey respectivamente. Se puede apreciar que la morfología colonial es la misma en ambos casos, así como el mismo color, indicando que ambos cultivos pertenecen a la misma clase de bacteria, correspondiente a *Klebsiella spp.*

En el cuadro 13 se presentan las medidas de los halos de inhibición que se obtuvieron al realizar los antibiogramas Gram positivos y Gram negativos. Para el caso de los Gram positivos, los antibióticos a los que se obtuvo mayor resistencia fueron la Cefalotina (CF) y la Dicloxacilina (DC), y el que presentó mayor sensibilidad fue la Ciprofloxacina (CPF). En los antibiogramas Gram negativos, el antibiótico al que se presentó mayor resistencia fue la Carbenicilina (CB), mientras los que presentaron mayor sensibilidad fueron Cloranfenicol (CL), Ciproflaxiacina (CPF) y Sulfametoxazol y Trimetoprim (SXT).

Cuadro 13. Halos de inhibición en mm de los antibiogramas realizados

	Antibiótico	MacConkey	EMB	Enterococc.	S-110	TCBS	Cetrimida
Gram (+)	TE	22 ⁺⁺⁺	22 ⁺⁺⁺	21 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	21 ⁺⁺⁺	14 ⁺⁺⁺
	VA	0 ⁺	0 ⁺	17 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺	18 ⁺⁺⁺	0 ⁺
	PE	0 ⁺	0 ⁺	18 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	16 ⁺⁺⁺	0 ⁺
	SXT	30 ⁺⁺⁺					
	E	0 ⁺	11 ⁺	18 ⁺⁺⁺	11 ⁺	17 ⁺⁺	10 ⁺
	GE	30 ⁺⁺⁺	14 ⁺⁺	0 ⁺	30 ⁺⁺⁺	0 ⁺	30
	CLM	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	30 ⁺⁺⁺	0 ⁺	0 ⁺
	CPF	30 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	21 ⁺⁺⁺	29 ⁺⁺⁺	16 ⁺	31 ⁺⁺⁺
	DC	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	30 ⁺⁺⁺	0 ⁺	0 ⁺
	CFX	30 ⁺⁺⁺	29 ⁺⁺⁺	15 ⁺⁺	18 ⁺⁺	0 ⁺	31 ⁺⁺⁺
	CF	0 ⁺	0 ⁺	0	30 ⁺⁺⁺	0 ⁺	0 ⁺
	AM	0 ⁺	0 ⁺	14	21 ⁺	0 ⁺	0 ⁺
Gram (-)	AM	0 ⁺	15 ⁺⁺⁺	16 ⁺⁺⁺	22 ⁺	18 ⁺⁺⁺	0 ⁺
	AK	30 ⁺⁺⁺	30 ⁺⁺⁺	0 ⁺	0 ⁺	0 ⁺	30 ⁺⁺⁺
	CB	24 ⁺⁺⁺	0 ⁺	0 ⁺	18 ⁺⁺	0 ⁺	17 ⁺⁺
	GE	30 ⁺⁺⁺	30 ⁺⁺⁺	13 ⁺⁺	14 ⁺⁺	14 ⁺⁺	30 ⁺⁺⁺
	CF	18 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺	14 ⁺⁺
	CFX	30 ⁺⁺⁺	30 ⁺⁺⁺	0 ⁺	16 ⁺⁺	18 ⁺⁺	31 ⁺⁺⁺
	NET	30 ⁺⁺⁺	30 ⁺⁺⁺	0 ⁺	13 ⁺⁺	0 ⁺	30 ⁺⁺⁺
	CPF	30 ⁺⁺⁺	21 ⁺⁺⁺	15 ⁺⁺	29 ⁺⁺⁺	16 ⁺⁺	25 ⁺⁺⁺
	NOF	30 ⁺⁺⁺	30 ⁺⁺⁺	14 ⁺⁺	15 ⁺⁺	16 ⁺⁺	30 ⁺⁺⁺
	CL	23 ⁺⁺⁺	28 ⁺⁺⁺	23 ⁺⁺⁺	30 ⁺⁺⁺	24	14 ⁺⁺
	SXT	30 ⁺⁺⁺	17 ⁺⁺	30 ⁺⁺⁺	30 ⁺⁺⁺	30 ⁺⁺⁺	30 ⁺⁺⁺
	NF	23 ⁺⁺⁺	24 ⁺⁺⁺	19 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺	26 ⁺⁺⁺	20 ⁺⁺⁺

+ Resistente, ++ Intermediamente sensible, +++Sensible de acuerdo al Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS). Lista de antibióticos en apéndice 14.



Figura 14. Prueba de fermentación de Manitol de las colonias crecidas en agar S-110 de tracto digestivo de adulto de *U. dermestoides*.

En la figura 14 se observa la prueba de fermentación de manitol de las colonias de bacterias crecidas en agar S-110, donde se aprecia un resultado positivo, ya que hubo un cambio de coloración de rojo a amarillo.

Con base en los resultados obtenidos, se realizó el cuadro 14, donde se observa la identificación de las bacterias presentes en el tracto digestivo del adulto de *U. dermestoides*.

Cuadro 14. Bacterias identificadas en tracto digestivo del adulto U. dermestoides.

Agar	Morfología colonial	Morfología microscópica	Otras pruebas	Género o especie
S-110	Color blanquecino textura lisa, redondas.	Estafilococos Gram positivos	Fermentación de manitol positiva	<i>Staphylococcus aureus.</i>
Enterococcosel	Color blanquecino-transparente, muy pequeñas, cambio de color del agar a negro	Cocos Gram positivos	-	<i>Enterococcus spp.</i>
EMB	Coloración púrpura, consistencia mucosa	Bacilos Gram negativos	Coloración azul turquesa en CHROMagar	<i>Klebsiella spp.</i>
MacConkey	Coloración púrpura-rosada, consistencia mucosa, lisa.	Bacilos Gram negativos	Coloración azul turquesa en CHROMagar	<i>Klebsiella spp.</i>
TCBS	Coloración amarilla, colonias pequeñas cambio en color de agar a amarillo	Cocos Gram positivos	-	<i>Enterococcus spp.</i>
Cetrimida	Coloración blanquecina, consistencia lisa.	Bacilos Gram negativos	-	<i>Pseudomonas spp.</i>

(-) No se realizó la prueba.

DISCUSIÓN

La ingesta de *U. dermestoides* dentro de la medicina tradicional en la coleopteroterapia (Cupul-Magaña, 2010), crea la necesidad de saber si ésta no representa un riesgo para los consumidores, ya que la presencia de microorganismos patógenos pueden ser causante de enfermedades.

En el cuadro 5 se observa la identificación bacteriana de la epicutícula de la larva de *U. dermestoides* con base a la morfología colonial que se presentó en los cultivos en los agares diferenciales en donde se desarrollaron las bacterias y la morfología microscópica con tinción de Gram (Figura 4). Se determinó que las bacterias presentes son del género *Klebsiella*, *Enterococcus* y *Staphylococcus*. Para el caso de *Staphylococcus*, dio como resultado positivo a la prueba de fermentación de manitol (Figura 5), característica distintiva para la especie *Staphylococcus aureus*.

Esto concuerda en con lo reportado por Medina et al. (2015), quienes reportan la presencia de 3 especies diferentes de *Klebsiella* en organismos adultos de *U. dermestoides*. Sin embargo, no se encontró más literatura con respecto a bacterias presentes en epicutícula de larva de *U. dermestoides*.

Las bacterias del género *Klebsiella* pertenecen a la familia Enterobacteriace, éstas son omnipresentes en la naturaleza y pueden encontrarse tanto en tracto digestivo de humanos como en el de animales o en superficies mucosas de éstos (Cadavid-Sánchez et al., 2015; Podsuchun y Ullmann, 1998), por lo que la presencia de éstas en la epicutícula de las larvas de *U. dermestoides* se deba a que fueron contaminadas durante su manipulación; a pesar de que se tuvieron los manejos adecuados y de limpieza, la obtención de los ejemplares fue por medio de un productor particular, el cual probablemente no tenía ningún tipo de control en el manejo del cultivo de los escarabajos. De igual manera estas bacterias posiblemente formen parte de la microbiota intestinal de la larva y por lo tanto, al defecar las bacterias se impregnan en la epicutícula de las larvas que se desplazan por el sitio del deshecho, fungiendo así como vectores mecánicos de la

bacteria. Dawe (2006), reporta que ejemplares de adultos y larvas de un escarabajo de la familia Tenebrionidae (*Alphitobius diaperinus*), fungen como vectores y reservorio de microorganismos transmisibles.

Así mismo, las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus*, se pueden encontrar en superficies del entorno ambiental y están presentes en la microbiota intestinal de casi todos los animales incluyendo al humano (Harrington et al., 2004), así que los motivos de la presencia de éstas en la epicutícula de la larva, probablemente sean similares a los estimados por la presencia de *Klebsiella*.

Staphylococcus aureus, es un microorganismo que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente, está presente en la flora bacteriana común en humanos. De acuerdo a Zendejas-Manso et al. 2014, *S. aureus* tiene una gran capacidad de adaptación, por lo que es capaz de propagarse de manera muy fácil a nivel inter-especie en animales. Por lo tanto, la presencia de éstas en la epicutícula de *U. dermestoides* podría deberse a la manipulación por parte de individuos portadores de la bacteria antes de ser adquiridos.

De igual manera no se encontró literatura referente a presencia de levaduras en cutícula de larvas de *U. dermestoides*, sin embargo Villaverde (2014), reporta que en algunos insectos plaga de granos almacenados, entre ellos *U. dermestoides*, los lípidos e hidrocarburos cuticulares, pueden actuar como fuente de carbono para el desarrollo de las primeras etapas de crecimiento y penetración de hongos entomopatógenos, lo cual podría explicar la presencia de *Candida tropicalis* en su epicutícula (Figura 6).

Con respecto a los antibiogramas, en el cuadro 4 se aprecia que las bacterias son resistentes a los antibióticos: Penicilina (PE), Dicloxacilina (DC), Cefuroxima (CXM), Ampicilina (AM), Ceftazidime (CAZ) y Cefalotina (CF), los cuales son pertenecientes al grupo de antibióticos β -Lactámicos, distintivos por actuar a nivel de pared celular bacteriana, interfiriendo en la síntesis de peptidoglucano (Gómez et al., 2015). De acuerdo a lo reportado por García (2014) y Camarena y Sánchez (1999), esta resistencia se debe a que las bacterias determinadas cuentan con la

presencia de enzimas β -Lactamasas, las cuales hidrolizan el enlace amida del anillo β -Lactámico, inhibiendo así el efecto bactericida de éste.

Con relación a los resultados obtenidos a los cultivos realizados de la epicutícula del adulto, al no presentar crecimiento en los agares diferenciales de TCBS y Cetrimida como se observa en el cuadro 5 se descarta la presencia de bacterias pertenecientes al género de *Pseudomonas* o *Vibrio*.

En la figura 7, se observa la morfología colonial de los cultivos bacterianos en los diferentes agares diferenciales, así como su morfología microscópica con tinción de Gram. Con base en los resultados obtenidos se determinó que las bacterias que crecieron en agar MacConkey y EMB son pertenecientes al género *Klebsiella*, las presentes en agar Enterococcosel al género *Enterococcus*, y las presentes en S-110 a *Staphylococcus*. Éste último, después de un resultado positivo para la prueba de fermentación de manitol (Figura 8), se determinó la especie de *Staphylococcus aureus*.

Esto concuerda con lo reportado por Medina et al. 2015, quienes reportan la presencia de 3 especies diferentes de *Klebsiella* en organismos adultos de *U. dermestoides*.

Como se describe anteriormente para el caso de la epicutícula de la larva, las bacterias del género *Klebsiella* son omnipresentes en la naturaleza y están presentes tanto en tracto digestivo de humanos y animales como en superficies mucosas de éstos (Cadavid-Sánchez et al., 2015; Podsuchun y Ullmann 1998), Estas bacterias probablemente se encuentran en la epicutícula del adulto debido al entorno en donde se desarrolla toda la colonia del escarabajo, ya que están en contacto directo con las larvas de éste, coexisten en el mismo recipiente. De igual manera, la presencia de bacterias del género *Enterococcus* y de *Staphylococcus aureus*, se deba a estos mismos motivos, ya que ambas bacterias son de fácil diseminación y ambas se encuentran presentes en mucosas y/o secreciones animales (Velásquez-Meza, 2005).

Con respecto a los antibiogramas realizados, se observa en el cuadro 6 los halos de inhibición que se obtuvieron, se aprecia que aquellos antibióticos a los que se presentó resistencia, Ampicilina (AM) Ceftazimida (CAZ), Cefuroxima (CXM), Penicilina (PE), Cefalotina (CF) y Cefepima (FEP). Estos antibióticos pertenecen a la familia de los β -Lactámicos (Seija y Vignoli, 2006). Como se describió anteriormente, éstos antibióticos inhiben la síntesis de peptidoglucano de la pared celular de las bacterias (Gómez et al., 2015), por lo que se estima un mecanismo de resistencia debido a enzimas β -Lactamasas.

En el cultivo realizado del tracto digestivo de la larva, tampoco se presentó diferencia en la morfología de las colonias bacterianas que se desarrollaron en el agar Müller-Hinton. Posteriormente de los cultivos realizados en los agares diferenciales, en el cuadro 7 se observa que sólo no hubo crecimiento en el agar Cetrimida.

De acuerdo a la morfología colonial y a la morfología microscópica después de la tinción de Gram, se determinó que las bacterias que crecieron en los agares MacConkey y EMB pertenecen al género *Klebsiella*, lo cual fue confirmado al resembrar en el CHROMagar Orientación (Figura 10), al resultar la misma morfología colonial para ambos cultivos. Con respecto a las crecientes en el agar S-110, corresponden al género *Staphylococcus* y tras haber dado positiva la prueba de fermentación de manitol (Figura 11), se determina la especie *S. aureus*. Para el caso del TCBS y Enterococcosel, se identificó el género de *Enterococcus*,

Inicialmente, tras observar la morfología colonial en el Agar TCBS, coincidía con la morfología de *Vibrio cholerae*, sin embargo, tras realizar el frotis después de Tinción de Gram, y observar que se trataba de cadenas de cocos Gram positivas, se descartó esa idea, ya que todas las bacterias del género *Vibrio* son bacilos Gram negativos (Said y Drasar, 1996).

No se encontró literatura relacionada con la larva de *U. dermestoides*, sin embargo Ji-Hyun et al. (2014), reportan que la diversidad microbiota del tracto digestivo en insectos depende de la dieta y del ecosistema habitacional del insecto,

demostrando que aquellos insectos con una dieta omnívora presentan mayor diversidad bacteriana que aquellos con una dieta carnívora. Esto podría explicar la diversidad de bacterias encontradas en el tracto digestivo de la larva. Como se explicó anteriormente, no se tiene algún control o cuidado con respecto a la manipulación del escarabajo dentro del tratamiento de la cadena del gorgojo, por lo que probablemente, las bacterias hayan sido adquiridas por pacientes inmunodeprimidos y/o enfermos, portadores de estas bacterias que estaban en contacto directo con el hábitat de los escarabajos.

Schimid et al. (2014), reportan que en el escarabajo *Harpalus pensylvanicus* (DeGeer) (Coleoptera: Carabidae), se tiene la presencia de bacterias del género *Enterococcus* en su tracto digestivo, y que éstas mismas facilitan el consumo de semillas para el hospedero. Al estar presentes bacterias *Enterococcus* en el tracto digestivo de la larva, esta relación probablemente también ocurre en *U. dermestoides*, ya que las semillas también forman parte de la dieta de este escarabajo (Castelli, 2005),

Ziganshina et al. (2018), por medio de secuenciación de genes bacterianos presentes en el tracto digestivo de varias larvas de diferentes escarabajos, detectaron la presencia de 4 filos bacterianos y establecen que estas comunidades microbiales ocupan un rol potencial en el aprovechamiento de varios recursos, siendo proveedores de necesidades nutricionales para el organismo. Esta situación, posiblemente también se esté llevando a cabo para el tracto digestivo de la larva de *U. dermestoides*, explicando así la diversidad de bacterias presentes.

Del cultivo realizado del tracto digestivo del adulto en el agar Müeller-Hinton, de igual manera no hubo crecimiento de colonias morfológicamente distintas. De los cultivos realizados en los agares diferenciales, hubo crecimiento en todos los agares empleados, como se observa en el cuadro 9.

En la figura 12, se observa las distintas morfologías coloniales de los cultivos bacterianos de los agares diferenciales, así como su morfología microscópica tras

haber realizado la tinción de Gram. De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó el género *Enterococcus* para las bacterias presentes en los agares TCBS y Enterococcosel, *Klebsiella* para las presentes en los agares EMB y MacConkey, confirmando el género al observar la morfología colonial distintiva en el CHROMagar Orientación (Figura 13) de los cultivos de las bacterias crecidas en estos agares, *Pseudomonas* para aquellas en el agar Cetrimida y *Staphylococcus* para las presentes en el agar S-110, la cual, posterior a dar positivo a la prueba de fermentación de manitol (Figura 14), se determinó como *Staphylococcus aureus*.

De igual manera no se encontró literatura relacionada directamente con la microbiota intestinal de *U. dermestoides*, pero sí de otras especies de Coleópteros.

Oyedokun y Adeniyi (2016), reportan la diversidad de la microbiota intestinal del escarabajo *Analeptes trifasciata* (Coleoptera: Cerambycidae), dentro de la diversidad encontrada, destaca la presencia de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus spp.* y *Pseudomonas spp.*, las cuales también fueron encontradas en el tracto digestivo de *U. dermestoides*. Los autores concluyen que esta diversidad de bacterias contribuye a la digestión y aprovechamiento de nutrientes en la dieta del organismo. Ésta situación, puede estar relacionada en el caso de *U. dermestoides*, y que la diversidad de bacterias presentes influya directamente en la nutrición del organismo.

Con respecto a los antibiogramas, en el cuadro 10 se observan los resultados de los halos de inhibición obtenidos. Los antibióticos a los que se obtuvo mayor resistencia fueron la Cefalotina (CF), la Dicloxacilina (DC), y la Carbenicilina (CB). Igualmente, antibióticos perteneciente la familia de los β - Lactámicos (Seija y Vignoli, 2006). Se estima el mismo posible mecanismo de resistencia bacteriana antes explicado.

La incidencia de las bacterias encontradas en las dos distintas etapas de vida del coleóptero, tanto como en la epicutícula como el tracto digestivo, sugiere que esta diversidad bacteriana encontrada, forma parte de la microbiota natural intestinal

del organismo, y que a su vez, éstas contribuyen en gran parte en el aprovechamiento y digestión de nutrientes en la dieta del escarabajo, ya que estas bacterias no resultan ser patógenas para *U. dermestoides*.

Las bacterias identificadas en *U. dermestoides*, son de alta importancia médica ya que son patógenas para el ser humano. *S. aureus* es responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida (Cervantes-García et al., 2014). Especies de *Klebsiella spp.* son determinadas como bacterias intrahospitalarias, provocando infecciones de difícil tratamiento, con afectación muy variada: tracto urinario, pulmones, tejidos blandos, área quirúrgica y sepsis (Echeverri y Cataño 2010). Con respecto al género *Enterococcus*, tienen poco potencial patogénico en el huésped normal; sin embargo, en el anciano y en el paciente inmunocomprometido, estos microorganismos constituyen patógenos oportunistas (Díaz et al., 2010).

Resulta alarmante la presencia de bacterias patógenas para el humano en ambos estadios de *U. dermestoides*, ya que al ser ingeridos dentro del tratamiento tradicionalista puede llegar a tener más desventajas que ventajas, sobre todo en las etapas del tratamiento en donde se llega a consumir más de 300 ejemplares en una semana (Cupul-Magaña, 2010), donde la cantidad de bacterias ingeridas puede llegar a desencadenar una infección con muchas complicaciones, debido a la resistencia frente a antibióticos que presentaron las bacterias.

CONCLUSIÓN

La epicutícula de la larva y adulto de *Ulomoides dermestoides* presenta bacterias del género *Klebsiella* y *Enterococcus* así como de *Staphylococcus aureus* y la levadura *Candida tropicalis* para el caso de la larva.

El tracto digestivo de la larva y adulto de *U. dermestoides* tiene presenta bacterias del género *Klebsiella* y *Enterococcus* así como de *Staphylococcus aureus* y el género *Pseudomonas* para el caso del adulto.

Las bacterias presentes en el tracto digestivo de *U. dermestoides*, posiblemente formen parte de la microbiota natural del organismo y contribuyan al aprovechamiento de nutrientes y digestión de la dieta del organismo.

La bacterias presentes en *U. dermestoides* son resistentes a antibióticos de la familia de los β - Lactámicos.

Este proyecto es el primero que expone información científica con respecto a las bacterias presentes en *U. dermestoides*, estableciendo las bases para futuras investigaciones en biotecnología y entomología médica.

LITERATURA CITADA

- Agurto, S.T. 2016. Técnicas de coloraciones de células y tejidos. Imprenta Unión. Recuperado de <http://cluboiab.blogspot.com/2016/05/tincion-de-gram.html>
- Becton Dickinson (BD). 2011. BD CHROMagar Orientation Medium. Recuperado de <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8811>.
- Becton Dickinson (BD). 2017. BD Müller Hinton Agar. Recuperado de <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8774>.
- Bouchard, P., Bousquet, Y., Davies, A.E., Alonso-Zarazaga M.A., Lawrence J.F., Lyal C.H.C., Newton A.F., Reid C.A.M., Schmitt, M., Slipinski S.A., Smith, A.B.T. 2011. Family –group names in Coleoptera (Insecta). ZooKeys 88: 1-972.
- Cadavid-Sánchez. I.C., Amat, E., Gómez-Piñerez L.M. 2015 Enterobacteria isolated from synanthropic flies (Diptera, Calypterae). *Caldasia* 37(2): 319-332.
- Camarena, J.J., Sánchez, R. 1999. Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Castelli, H. 2005. Descripción y Cría: *Palembus Ulomoides dermestoides*. Recuperado en www.lapureza.com.ar/gorgojos
- Cervantes-García, E., García-Gonzales, R., Slazar-Schettino, P.M. 2014. Características generales del *Staphylococcus auerus*.
- Cultimed. 2003. Manual Básico de Microbiología. Recuperado de <http://www.ictsl.net/downloads/microbiologia.pdf>. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio 61(1): 28-40.
- Cupul-Magaña, F. 2010. Sobre el uso de *Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1878), (Coleoptera, Tenebrionidae, Diaperini) en la coleopteroterapia: informe de un caso en Ixtapa, Jalisco, México. Boletín Asociación Española de Entomología 34: 419-422
- Dawe, J.F. 2006. Influencia del escarabajo del estiércol *Alphitobius diaperinus* como vector y reservorio de microorganismos transmisibles por los alimentos. *Selecciones Avícolas* 48(2): 79-82.
- Deloya, C., P.J., Saavedra. 2016 Estado de Arte: Diversidad e importancia. En C. Deloya. (Ed). *Escarabajos del Estado de Michoacán*. (pp. 1-22). Morelia, México. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo.

Díaz, P.M., Rodríguez, M.C., Zhurbenko, R. 2010. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 48:2 147-161.

DIBICO. 2017. Medio de Cultivo, Bacteriología General, catálogo 1019. Recuperado de http://www.probiotek.com/wp-content/uploads/2014/01/1019-E_AGAR-MACCONKEY.pdf

DIBICO. 2017. Medio de Cultivo, Bacteriología General, catálogo 1059. Recuperado de http://www.probiotek.com/wp-content/uploads/2014/01/1059-E_AGAR-DEXTROSA-Y-PAPA.pdf

DIBICO. 2017. Medio de Cultivo, Bacteriología General, catálogo 1059. Recuperado de http://www.probiotek.com/wp-content/uploads/2014/01/1011-E_AGAR-CON-EOSINA-Y-AZUL-DE-METILENO-EMB.pdf

Echeverri, T.L., Cataño, C.J. 2010 *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. Revista Médica de la universidad de Antioquía. 23:3 240-249.

Finke, M., D. Winn. 2004. "Insects and related arthropods: A nutritional primer for rehabilitators". Journal of Wildlife Rehabilitation 27: 14–17.

Galvis, S.J., Quiñones, R., Jimenez, P. 2009. Aislamiento de microorganismos del tracto digestivo de larvas de coleópteros y lepidópteros detritívoros y *evaluación in vitro* de su efecto antagónico en una cepa de *Fusarium oxysporum*. Facultad de Ciencias Básicas (5) 1:106-113.

Garcés, M.A.M., Arango, G.P.G., Gómez, F.T. 2009. Cría de *Ulomoides dermestoides*, Coleoptera: Tenebrionidae, en tres tipos de sustrato. Revista Lasallista de Investigación (6) 2: 64-68.

García, Z.C. 2014. Resistencia antibiótica de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus sp.*, en el Hospital Regional de Occidente de Quetzaltenango. (Tesis de Licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala.

Genta, F.A., Dillonb, R., Terra, W., Ferreira, C. 2006. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. Journal of Insect Physiology 52: 593–601.

Gómez, J., GarcíaVázquez, E., Hernández-Torres, A. 2015. Los betalactámicos en la práctica clínica. Revista Española d Quimioterapia 28(1): 1-9.

Harrington, S.M., Ross, T.L., Gebo, K.A., Merz, W.G. 2004. Vancomycin resistance, esp and strain relatedness: a 1-year study of enterococcal bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5895-5899

Ji-Hyun, Y., Seong, W.R., Tae, W.W., Mi-Ja, J., Min-Soo, K., Doo-Sang, P., Changmann, Y., Young-Do, N., Yun-Ji, K., Jung-Hye, C., Joon-Yong, K., Na-Ri, S., Sung-Hee, K., Won-Jae, L., Jin-Woo, B. 2014. Insects gut bacterial diversity determined by host environmental habitat, diet, developmental stage and phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology* (80) 17:5254-5264.

Jung, J., Heo, A., Woo, J.P., Ji, K.Y., Koh, H., Park, W. 2014. Gut microbiota of *Tenebrio molitor* and their response to environmental change. *Journal of Microbiology and Biotechnology* (24) 7:888-897.

Kriton, K., 2008. El escarabajo del asma y su empleo en la medicina tradicional. *Reptilia* 70: 34-42.

Medina, A., Córdova, L., Padilla, V., Macías, J.H. y Álvarez J.A. 2015. Presencia de enterobacterias en *Ulomoides dermestoides*. Universidad de Guanajuato.

MicroKit. 2015. Medios de cultivo, Cetrimide Agar (Base). Recuperado de: <http://www.medioscultivo.com/cetrimide-agar-base/>.

Mondragón, I., Contreras, P.Y. 2015. Uso de los insectos *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum* y *Palembus dermestoides* (Coleoptera, Tenebrionidae) como recursodidáctico en la enseñanza de las Ciencias Naturales. *Revista de Investigación* 86 (39): 255-270

NEOGEN. 2016. Agar TCBS. Recuperado de: http://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7210_sp_pi.pdf.

Olmos, F.A., García, F.C., Saéz, N.J., Valdezete, R.S. 2010. Métodos de identificación Bacteriana en el laboratorio de microbiología. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018. *E. coli*. Recuperado en <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.

Oyedokun, A.V., Adeniyi, D.O. 2016. Microbial Diversity in the Gut of Cashew Stem Girdler, *Analeptes trifasciata* Fabricius (Coleoptera: Cerambycidae), in Ibadan, Nigeria. *International Journal of Insect Science* (2016) 8:17-24.

Picazo, J., García, J., Cantón, R., García, E., Gómez-Lus, L., Martínez, L., Rodríguez-Avial, C., Vila, J. 2000. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid.

Podschun, R., Ullmann, U. 1998. Klebsiella spp. as nosocomial pathogen: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews* 11:589-603.

Quiroz, G.E. 2005. Aislamiento de bacterias y fagos para el control biológico de *Vibrio* spp. durante la eclosión de *Artemia*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional.

Rodríguez, C.E., Gamboa, C.M.M., López, U.D., Quesada, G.C., Rodríguez, S.C. 2016. Bacteriología General, Principios y Prácticas de Laboratorio. Universidad de Costa Rica. 2da. Edición.

Said, D., Drasar, B.S. 1996. *Vibrio Cholerae*, en Drasar, B.S., Forrest, B.D. (Eds.), *Cholera and the Ecology of Vibrio Cholerae*. Chapman & Hall, Londres, pp. 1-18.

Schmid, R.B., Lehman, R.M., Brözel, V.S., Lundgren, J.G. 2014. An indigenous gut bacterium, *Enterococcus faecalis* (lactobacillales: enterococcaceae), increases seed consumption by *Harpalus pensylvanicus* (COLEOPTERA: CARABIDAE). *Florida Entomologist* 97:2.

Seija, V., Vignoli, R. 2006. Principales Grupos de Antibióticos, en Universidad de La República (Eds.), *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 2da Edición, Oficina del Libro FEMUR, Uruguay, pp.631-647.

Suh, S.O., Marshall, C.J., McHugh, J.V., Blackwell, M. 2003. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. *Molecular Ecology*. 12 3137-3145

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. 2007. Introducción a la Microbiología. Panamericana. 9a. Edición.

Vasanthakumar, A., Handelsman, J., Schloss. P., Bauer, I., Raffa. K. 2008. Gut microbiota of an Invasive Subcortical Beetle, *Agrilus planipennis* Fairmaire, Across Various Life Stages. *Environmental Entomology* 37(5): 1344-1353.

Velásquez-Meza, M.E. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente, *Salud Pública Mex*; 47:381-387.

Villaverde, M.L. 2014. Lípidos y Feromonas de insectos plaga de granos almacenados (Tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata.

Zaragoza, R., Gimeno, C., Pemán, J., Salavert, M. 2007. Microbiología aplicada al paciente crítico. Panamericana. Madrid.

Zendejas-Manzo, G.S., Avalos-Flores, H., Soto-Padilla, M.Y. 2014 Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Revista Biomédica 25: 129-143

Ziganshina, E.E., Mohammed, W.W., Shagimardanova, E.I., Vankov, P.Y., Gogoleva, N.E., Ziganshin, A.M. 2018. Fungal, Bacterial, and Archaeal Diversity in the Digestive Tract of Several Beetle Larvae (Coleoptera.). Biomed Research International 23146133. pp. 15.

APÉNDICES**Apéndice 1****➤ Cultivo de *Ulomoides dermestoides* (Castelli, 2005).****Cuadro 15. Taxonomía de *U. dermestoides***

Reino: Animalia.
Filo: Arthropoda.
Subfilo: Hexapoda.
Clase: Insecta.
Orden: Coleóptera.
Familia: Tenebrionidae.
Género: *Palembus* (*Ulomoides*).
Especie: *dermestoides*.
Nombre científico: *Ulomoides dermestoides*.



Figura 15. *U. dermestoides* en etapa adulta. Tomado de Castelli 2005.

Descripción y generalidades de la especie

Ulomoides dermestoides es un escarabajo perteneciente a la familia Tenebrionidae, que generalmente es conocido como gorgojo. Estos organismos presentan forma del cuerpo oblonga, aplanada, la cabeza es tipo prógnata, ojos compuestos prominente, fácilmente diferenciable en cualquier posición de los adultos y poseen fuertes mandíbulas. Son de color negro en su etapa adulta y miden aproximadamente 5 mm de largo. Necesitan ciertas condiciones

ambientales para proliferar, la temperatura de crecimiento tiene un rango desde los 18° hasta los 31°C, una temperatura mayor o menor a partir del rango establecido pueden afectar su crecimiento y su tasa de reproducción. Necesitan humedad, generalmente entre un 50-70% y se desarrollan mejor en oscuridad.

Durante su desarrollo tiene 11 estadios larvales en la que duran aproximadamente de 4-5 días dependiendo de las condiciones ambientales, posteriormente entran a fase de pupa, durando 5-6 días. De la pupa emerge un juvenil gorgojo de coloración blanquecina, que se va tornando marrón y finalmente negra cuando alcanzan la madurez. Tienen una vida promedio de 60-90 días, aunque se puede extender si el alimento es abundante y las condiciones de temperatura son apropiadas.

Distribución

Se presume que estos coleópteros son provenientes de Asia, en específico China y Mongolia, posteriormente fueron introducidos a Sudamérica en donde fueron considerados plaga en países como Argentina, Colombia y Chile donde atacaban almacenes y cultivos de cereales. Hace unos años fueron usados en la coleopteroterapia y se distribuyeron en casi toda Latinoamérica a excepción de Brasil.

Alimentación

La alimentación de estos escarabajos se basa principalmente en cereales como el trigo, avena, harina, cebada, entre otras; aunque es necesario alimentarlos de manzana y lechuga ya que de ahí obtienen su fuente de agua. Se ha demostrado que también se pueden alimentar de productos como tortilla y pan integral.

Apéndice 2

➤ Extracción de tracto digestivo de larva y adulto de coleóptero por micro disección. (Modificado de Vasanthakumar, 2008).

Dentro de una campana de flujo laminar estéril, la cabeza y el último segmento abdominal de la larva se cortan, posteriormente el cuerpo de la larva se abre longitudinalmente con tijeras de disección y se extrae el tracto digestivo.

En adultos, el tórax del organismo se sujeta con fórceps de punta fina, la cabeza del organismo se separa del tórax hasta que el tracto digestivo entero sale del cuerpo, pero aún unido a este. El tracto posteriormente se retira del organismo por medio de un corte en el extremo unido al resto del cuerpo.



Figura 16. Extracción de tracto digestivo de Adulto de *U. dermestoides*.

Apéndice 3

➤ Agar Müller Hinton (Becton Dickinson, 2017).

USO:

El agar Müller-Hinton es un medio de cultivo microbiológico utilizado comúnmente para realizar la prueba de susceptibilidad a antibióticos.

PRINCIPIO:

Dado que los laboratorios de microbiología clínica utilizaban a principios de la década de 1960 una amplia variedad de procedimientos para determinar la sensibilidad de bacterias a antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos, Baüer, Kirby y otros desarrollaron un procedimiento estandarizado en el que se seleccionó como medio de prueba el agar Müller Hinton, un medio originalmente diseñado para el aislamiento de gonococos. Un estudio colectivo internacional posterior, confirmó el valor del agar Müller Hinton para este propósito por la reproducibilidad relativamente buena del medio, la sencillez de su fórmula y la riqueza de los datos experimentales que habían sido acumulados utilizando este medio.

Cuadro 16. Composición de Agar Müller Hinton por litro de agua destilada.

Extracto de carne bovina	2 g/L
Hidrolizado ácido de caseína	17.5 g/L
Almidón	1.5 g/L
Agar	17 g/L

PREPARACIÓN

Rehidratar 38 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión)

durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles.

Apéndice 4

➤ Agar Dextrosa Papa (PDA) (DIBICO, 2017).

USO:

Para cultivo y recuento de hongos y levaduras en productos lácteos, bebidas embotelladas y alimentos. Como medio preparado (Catálogo 1059-P) para la cuenta de hongos y levaduras en líquidos.

PRINCIPIO:

La infusión de papa como fuente de almidones y la dextrosa son la base para el crecimiento de hongos y levaduras. El bajo pH (3.5) evita el crecimiento de las bacterias. Cuando se va a usar para el recuento de hongos y levaduras, agregar al medio de cultivo una vez esterilizado y enfriado aproximadamente a 45°C, 14 mL de una solución estéril de ácido tartárico al 10% para obtener un pH aproximado de 3.5. Sembrar el medio de cultivo por estría en la superficie o adicionar la muestra para la técnica de vaciado en placa. Incubar hasta 7 días a temperatura ambiente.

Cuadro 17. Composición de Agar PDA por litro de agua destilada.

Agar	15 g/L
Dextrosa	20 g/L
Infusión de papa	4 g/L

PREPARACION:

Rehidratar 39 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar de acuerdo a la técnica a seguir en cajas de Petri estériles. Cuando se requiera el medio inclinado

en tubo, distribuirlo antes de esterilizar. Si se acidifica el medio, no sobrecalentar y fundir solo una vez, para evitar la hidrólisis del agar.

Apéndice 5

➤ Agar con Eosina y Azul de Metileno (EMB) (DIBICO, 2017).

USO:

Es un medio ligeramente selectivo y diferencial para el aislamiento de microorganismos entéricos a partir de diversas muestras

PRINCIPIO:

El Agar con Eosina y Azul de Metileno es una combinación del medio de Levine y el de Holt-Harris y Teague, contiene una mezcla de peptonas según Levine y presenta dos carbohidratos lactosa y sacarosa. Este medio de cultivo permite una diferenciación muy clara entre las colonias de organismos fermentadores de lactosa y aquellos que no la fermentan; el contenido de eosina y azul de metileno inhiben en cierto grado organismos Gram positivos. La presencia de sacarosa permite para algunos miembros del grupo coliforme fermentarla con más facilidad que la lactosa. Las colonias lactosa positiva son azules a moradas con brillo metálico o poseen centros oscuros con periferias transparentes incoloras y las que son negativas en lactosa o sacarosa, se observan incoloras o rosa pálido transparentes.

Cuadro 18. Composición de Agar EMB por litro de agua destilada.

Agar	13.5	Lactosa	5
Azul de Metileno	0.065	Peptona especial	10
Eosina Y	0.4	Sacarosa	5
Fosfato dipotásico	2.0		

PREPARACION:

Rehidratar 36 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (5 lb. de presión)

durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Conservar a temperatura ambiente.

Apéndice 6

➤ Agar MacConkey (DIBICO, 2017).

USO:

Es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento de organismos coliformes, *Salmonella* y *Shigella* a partir de diversas muestras.

PRINCIPIO:

Las sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de gérmenes Gram positivos. La lactosa y el indicador de pH rojo neutro, permiten la diferenciación de las bacterias lactosa positiva (colonias rosa intenso con halo de precipitación), de las no fermentadoras (colonias transparentes o ámbar). Sembrar el medio de cultivo con la muestra problema por estría cruzada. Incubar 24 h a 35°C.

Cuadro 19. Composición de Agar Mac Conkey por litro de agua destilada.

Agar	13.5 g/L	Mezcla de sales biliares	1.5 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L	Peptona especial	3 g/L
Cristal violeta	0.001 g/L	Peptona de gelatina	17 g/L
Lactosa	10 g/L	Rojo neutro	0.03 g/L

PREPARACION:

Rehidratar 50 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar en cajas de Petri estériles. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

Apéndice 7

➤ Agar Estafilococos no.110 (S-110) (DIBCO, 2017).

USO:

El Agar Estafilococos 110 es utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos con base en la fermentación de manitol, la formación de pigmento y la hidrólisis de gelatina.

PRINCIPIO:

En este medio la peptona provee la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El extracto de levadura proporciona vitaminas del complejo B. La alta concentración de cloruro de sodio tiene un efecto en el desarrollo selectivo de los estafilococos. La lactosa y el D-manitol proporcionan la fuente de energía. La gelatina es el sustrato para la enzima gelatinasa. El agar es usado como agente solidificante.

Cuadro 20. Composición de Agar S-110 por litro de agua destilada.

Gelatina bacteriológica	30 g/L	Lactosa	2 g/L
Extracto de levadura	2.5 g/L	D- Manitol	10 g/L
Peptona de caseína	10 g/L	Cloruro de sodio	75 g/L
Fosfato dipotásico	5 g/L	Agar Bacteriológico	15 g/L

PREPARACIÓN:

Suspender 149 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles.

Apéndice 8

➤ Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) (NEOGEN, 2016).

USO:

El Agar TCBS es utilizado para el aislamiento selectivo de *Vibrio cholerae* y otros vibrios entero patogénicos

PRINCIPIO:

Extracto de levadura, digerido enzimático de caseína y el digerido enzimático de tejido animal proporcionan el nitrógeno, vitaminas y los aminoácidos en el agar TCBS. El citrato de sodio, tiosulfato de sodio, colato de sodio, y la bilis de buey son los agentes selectivos que proporcionan un pH alcalino para inhibir los organismos Gram positivos y suprimir los coliformes. Se usa un pH elevado para mejorar el crecimiento de *Vibrio cholerae*, debido a que este organismo es sensible a los ambientes ácidos. La sacarosa es el carbohidrato fermentable. El cloruro de sodio estimula el crecimiento de los organismos y mantiene el balance osmótico del medio. El tiosulfato de sodio es también una fuente de azufre y actúa con el citrato férrico como un indicador para detectar la producción de sulfuro de hidrógeno. El azul de bromotimol y el azul de timol son los indicadores de pH. El agar es el agente solidificante.

Cuadro 21. Composición de Agar TCBS por litro de agua destilada.

Extracto de Levadura	5 g/L	Colato de Sodio.	3 g/L
Digerido Enzimático de Caseína	5 g/L	Sacarosa (Sucrosa).	20 g/L
Digerido Enzimático de Tejido Animal	5 g/L	Cloruro de Sodio	10 g/L
Citrato de Sodio	10 g/L	Citrato Férrico	1 g/L
Tiosulfato de Sodio	10 g/L	Azul de Bromotimo	0.04 g/L
Bilis de Buey (Oxbile)	5 g/L	Azul de Timol	0.04 g/L

PROCEDIMIENTO

Suspenda 88 g del medio en un litro de agua purificada. Caliente la solución agitando frecuentemente y permita que hierva por un minuto para disolver completamente el medio. NO AUTOCLAVAR.

Apéndice 9

➤ Agar Cetrimida (MicroKit, 2015).

USO:

El medio Cetrimide Agar (Pseudosel Agar), es un medio selectivo para el aislamiento e identificación del *Pseudomonas aeruginosa*.

PRINCIPIO:

King et al. (1954), desarrollaron un medio denominado Medio A con el fin de poner en evidencia la producción de Píocianina por la *Pseudomonas*. El Cetrimide Agar es una modificación donde se ha incorporado la Cetrimida (bromuro de cetiltrimetilamonio), compuesto de amonio cuaternario, como agente inhibidor de la mayoría de la flora acompañante de *Pseudomonas*. Las cepas de *Pseudomonas* son diferenciadas de otras especies por la producción de Píocianina, pigmento azul, soluble en agua, que unido a la morfología de las colonias y la producción de un característico olor a aminoacetofenona, permite la identificación de la *P. aeruginosa*. La producción de Píocianina es estimulada por la presencia de cloruro magnésico y del sulfato potásico. El Cetrimide Agar, está recomendada para análisis de cosméticos, productos farmacéuticos y muestras clínicas, y también para la evaluación de desinfectantes.

Cuadro 22. Composición de Agar Cetrimida por litro de agua destilada.

Hidrolizado pancreático de gelatina	20 g/L
Cloruro magnésico	1.4 g/L
Sulfato potásico	10 g/L
Cetrimida (Bromuro de Cetiltrimetilamonio)	0,3 g/L
Agar	15 g/L

PROCEDIMIENTO:

Disolver 44.5 g de medio en 1 litro de agua destilada, añadir 10 mL de glicerol, calentar hasta ebullición, agitando para su disolución, autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles.

Apéndice 10

➤ Agar Enterococcosel (Cultimed, 2003).

USO:

Enterococcosel Agar es un medio selectivo para el aislamiento y el recuento de *Streptococcus faecalis* (grupo D) en muestras clínicas y no clínicas, sustitutivo del Bilis Esculina Agar

PRINCIPIO:

Este medio se basa en la fórmula de Agar Bilis Esculina de Rochaix, modificada más tarde por Isenberg y colaboradores al reducir la concentración de bilis y añadir azida sódica. Esta modificación se suministra como Enterococcosel Agar. El medio es una fórmula estándar para el aislamiento de enterococcus. Dos peptonas proporcionan los nutrientes. Los streptococos del grupo D (incluidos los enterococos) hidrolizan la esculina para formar esculina y glucosa. La esculina reacciona con una sal férrica para formar un complejo marrón oscuro o negro. Se incluye el citrato férrico como indicador, que reacciona con la esculina para producir un complejo de marrón a negro. Se utiliza bilis de buey para inhibir las bacterias Gram positivas diferentes de los enterococos. La azida sódica inhibe los microorganismos Gram negativos.

Cuadro 23. Composición de Agar Enterococcosel por litro de agua destilada.

Digerido pancreático de caseína	17 g/L	Esculina	1 g/L
Digerido péptico de tejido animal	3 g/L	Citrato Férrico Amónico	0.5 g/L
Extracto de levadura	5 g/L	Azida sódica	0.25 g/L
Bilis de buey	10 g/L	Citrato sódico	1 g/L
Cloruro sódico	5 g/L	Agar	13.5 g/L

PREPARACIÓN:

Disolver 42.6 gramos del medio en un litro de agua destilada, mezclar bien y caliente la solución agitando frecuentemente y permita que hierva por un minuto para disolver completamente el medio. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles.

Apéndice 11

➤ CHROMagar Candida (MicroKit, 2015).

USO:

CHROMagar *Candida* es un medio selectivo para el aislamiento e identificación presuntiva de levaduras y mohos filamentosos y diferenciación de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*

PRINCIPIO:

Debido a las diferencias en morfología y color de las colonias de levaduras, este medio facilita la detección de mezclas de cepas de levaduras en la muestra analizada. También puede ser usado como un medio selectivo para el aislamiento de otras levaduras o mohos filamentosos en lugar de Agar Sabouraud Dextrosa.

Cuadro 24. Composición de CHROMAgar Candida por litro de agua destilada.

Cromopeptona	10 g/L
Glucosa	20 g/L
Mezcla cromogénica	2 g/L
Cloranfenicol	0.5 g/L
Agar	15 g/L

PROCEDIMIENTO:

Disolver 20 g de CHROMagar *Candida* en 250 mL de agua destilada estéril. Calentar la mezcla (< 100°) hasta disolución completa. El medio no requiere esterilización por autoclave, sin embargo, después de enfriado en baño de agua a 45°C, el agar debe ser vertido en placas. Luego de solidificadas, las placas deben almacenarse a 4°C hasta su uso.

Apéndice 12

➤ **CHROMagar Orientation (Becton Dickinson, 2011).**

USO:

BD CHROMagar Orientation Medium es un medio no selectivo para el aislamiento, la identificación directa, la diferenciación y el recuento de patógenos de las vías urinarias. BD CHROMagar Orientation Medium permite la diferenciación e identificación de *Escherichia coli* y *Enterococcus* sin pruebas de confirmación.

PRINCIPIO:

Las evaluaciones de rendimiento han demostrado que BD CHROMagar Orientation Medium es superior a los medios de diferenciación comúnmente utilizados para el aislamiento, la diferenciación y el recuento de los patógenos urinarios, tales como el agar CLED o una combinación de agar sangre y agar MacConkey3-5. BD CHROMagar Orientation Medium hace posible la identificación de *E. coli* y los enterococos directamente en la placa de aislamiento. Además, la identificación presuntiva de la mayoría de las cepas de *Staphylococcus saprophyticus* y *S. agalactiae*, así como también los grupos de *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (=KES) y *Proteus-Morganella-Providencia* (=PMP) es posible mediante la coloración de colonias y medios. En el agar peptonas especialmente seleccionadas suministran los nutrientes. La mezcla de cromógenos está formada por sustratos artificiales (cromógenos) que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas microbianas específicas, por lo que se asegura la diferenciación directa de determinadas especies o la detección de ciertos grupos de organismos, con sólo un mínimo de pruebas de confirmación.

Cuadro 25. Composición de CHROMAgar Orientation por litro de agua destilada.

Cromopeptona	16.1 g/L
Mezcla cromogénica	1.3 g/L
Agar	15 g/L

PROCEDIMIENTO:

Disolver 33 gramos del medio en 1 litro de agua purificada, Calentar la mezcla (< 100°) hasta disolución completa. Posteriormente autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C agitando suavemente y verter en placas Petri estériles. Luego de solidificadas, las placas pueden almacenarse a 4-8 °C hasta su uso.

RESULTADOS:**Cuadro 26. Interpretación de resultados en CHROMagar Orientation.**

Bacteria	Morfología y coloración colonial
<i>E.coli</i>	Rosa oscuro a rojizo
<i>Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia</i>	Azul metálico (+/- halo rojizo)
<i>Proteus, Morganella, Providencia</i>	Halo de color marrón
<i>Proteus vulgaris</i>	Azul con halo de color marrón
<i>Pseudomonas</i>	Translúcidas (+/- pigmentación natural de crema a verde)
<i>Acinetobacter</i>	Crema
<i>Stenotrophomonas</i>	Incoloro
<i>Enterococcus</i>	Azul turquesa
<i>S. aureus</i>	dorado, opaco, pequeño tamaño
<i>S.epidermidis</i>	crema, colonias puntiformes
<i>S.saprophyticus</i>	rosa, opaco, pequeño tamaño

Apéndice 13

➤ Tinción de Gram (Rodríguez et al., 2016)

USO:

Esta tinción desarrollada por el doctor Christan Gram en 1884, es hoy la más utilizada en los laboratorios de bacteriología y permite, de acuerdo a la estructura y grosor de la pared bacteriana, agrupar las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. Esta tinción además, correlaciona con otras propiedades bacterianas como endotoxinas, susceptibilidad a antibióticos, sensibilidad o resistencia a sales biliares, punto isoeléctrico y tensión superficial.

PRINCIPIO:

Las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares. La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglucano. La pared de la célula Gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglucano así como algo de ácido teicoico. Generalmente, 80%-90% de la pared de la célula Gram-positiva es peptidoglucano. La pared de la célula Gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglucano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula Gram-negativa es peptidoglucano.

Las células fijadas al calor sobre un portaobjetos se tiñen, primero con una solución de cristal violeta y son lavadas después para quitar el exceso de colorante. En este estado, todas las células, tanto las Gram positivas como las Gram negativas, están teñidas de azul.

El portaobjetos se cubre entonces con una solución de yodo-yoduro potásico. El ingrediente activo es aquí el I_2 ; el KI simplemente hace soluble el I_2 en agua. El

I₂ entra en las células y forma un complejo insoluble en agua con el cristal violeta. De nuevo tanto las células Gram positivas como las Gram negativas se encuentran en la misma situación.

Se lleva a cabo después la decoloración, usando una mezcla de alcohol-acetona, sustancias en las que es soluble el complejo I₂-cristal violeta. Algunos organismos (Gram positivos) no se decoloran, mientras que otros (Gram negativos) lo hacen. La diferencia esencial entre esos dos tipos de células está por tanto en su resistencia a la decoloración; esta resistencia se debe probablemente al hecho de que en el caso de bacterias Gram-negativas, la mezcla de alcohol/acetona es un solvente lipídico y disuelve la membrana exterior de la pared de la célula (y también puede dañar la membrana citoplásmica a la que se une peptidoglucano). La delgada capa de peptidoglucano es incapaz de retener el complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora. Las células Gram positivas, a causa de sus paredes celulares más espesas (tienen más peptidoglucano y menos lípido), no son permeables al disolvente ya que éste deshidrata la pared celular y cierra los poros, disminuyendo así el espacio entre las moléculas y provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Después de la decoloración las células Gram positivas son todavía azules, pero las Gram negativas son incoloras.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Se fijan las células en un portaobjetos, tomando una pequeña cantidad de bacterias de un cultivo y esparciéndolas en ésta con una gota de agua y dejándola secar.
- 2.- Se tiñe la preparación con Cristal violeta durante 1 minuto y posteriormente se retira el exceso con agua.
- 3.- Se adiciona Yoduro (Iugol) durante 1 minuto posteriormente se retira el exceso con agua.

4.- Se adiciona la solución alcohol-cetona durante 4 segundos y se retira con agua.

5.-Se tiñe con safranina durante 20-40 segundos.

RESULTADOS:

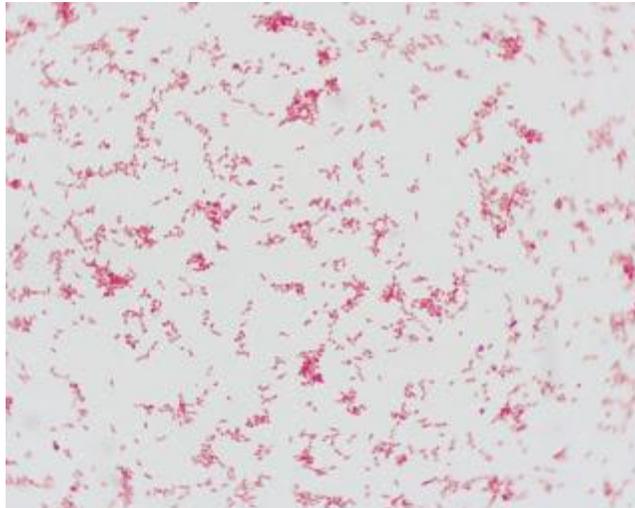


Figura 17 Bacterias Gram negativas (Tomado de Agurto, 2016)



Figura 18 Bacterias Gram positivas (Tomado de Agurto, 2016)

Apéndice 14

- **Antibiogramas por difusión en disco (Zaragoza et al., 2007 y Picazo et al., 2000).**

USO:

El antibiograma es un método de estudio *in vitro* del comportamiento de los antibióticos frente a los agentes infecciosos. Tiene como finalidad proporcionar información útil para la iniciación y marcha terapéutica anti infecciosa. Con los resultados obtenidos se clasifican a las bacterias en sensibles, medianamente sensibles y resistentes a un antibiótico determinado.

PRINCIPIO:

Por su sencillez, la técnica de difusión con discos. o disco-placa, es uno de los métodos más utilizados. Emplea discos de papel impregnados con una solución estandarizada del antibiótico que se disponen sobre la superficie de un medio sólido previamente inoculado en su superficie con una suspensión bacteriana. El disco libera, en contacto con el medio sólido, el antibiótico que difunde sobre éste, generando un gradiente de concentración a su alrededor. En la zona más acercada al disco, la concentración es elevada y menor en la más alejada. Cuando ésta es superior al valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se observa un halo de inhibición alrededor del disco. El diámetro del halo formado durante la incubación de 18 horas está en relación con el grado de sensibilidad o resistencia del microorganismo a la acción del antibiótico. La carga del disco está ajustada para que los halos de inhibición permitan diferenciar los microorganismos sensibles de los resistentes.

PROCEDIMIENTO:

1.- Preparación del inóculo: Tomar de 3 a 5 colonias iguales de la placa de cultivo de 18 a 24 horas y sembrarlas en 5 ml de un medio líquido (Brain-Heart, Todd Hewitt, Tripticasa soja, etc.) e incubar en la estufa a 35°C durante 2 a 6 horas hasta conseguir o superar una turbidez del 0.5 de la escala de MacFarland.

2.- Inoculación de las placas: Antes de que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, introducir un escobillón dentro de la suspensión y al retirarlo rotar varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo. Posteriormente, en placas de Mueller-Hinton Inocular completamente, sin dejar ninguna zona libre.

3.- Dispensación de los discos: Colocar los discos con los dispensadores o manualmente con pinzas estériles. Debe asegurarse que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que deben presionarse ligeramente sobre la superficie del agar. No deben situarse a menos de 15 mm del borde de la placa, y han de estar distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición. Para placas de 150 mm no se emplearán más de 12 discos y para las de 100 mm no más de 6. Posteriormente incubar a 36 °C durante 24 horas.

4.- Lectura de resultados: Después de 18 horas de incubación leer el diámetro de las zonas de completa inhibición con un pie de rey o regla.

Abreviaciones de Antibióticos:

PE: Penicilina

DC: Dicloxacilina

PEF: Pefloxacin

CXM: Cefuroxima

GE: Gentamicina

CTX: Ceftriaxona

SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprim

TE: Tetraciclina

AM: Ampicilina

E: Eritromicina

CAZ: Ceftazidima

CF: Cefalotina

LEV: Levofloxacin

NET: Netilmicina

FEP: Cefepima

AK: Amikacina

CRO: Ceftriaxona

CL: Cloranfenicol

NF: Nitrofurantona