



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

**FORMACION DE UNA SUBCOLECCION DE BACILOS
GRAMPOSITIVOS PARA FINES DIDACTICOS**

TESIS MANCOMUNADA

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a n :

Elisa Patricia Chávez Rosas

y

Luis Miguel Jaimes García

México, D. F.

Noviembre 1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Pags.
INTRODUCCION	14
Capítulo 1. GENERALIDADES	14
1.1. Bacilos Grampositivos.	15
1.2. Bacilos Grampositivos esporulados.	16
1.2.1. Género <u>Bacillus</u>	16
1.2.2. Género <u>Clostridium</u>	47
1.3. Bacilos Grampositivos no esporulados.	59
1.3.1. Género <u>Lactobacillus</u> .	61
1.3.2. Género <u>Listeria</u> .	73
1.4. Cuadros comparativos de características bioquímicas de los géneros mencionados	78
Capítulo 2. APLICACIONES A LA ENSEÑANZA	83
Capítulo 3. PARTE EXPERIMENTAL	90
3.1. Material.	91
3.1.1. Material de laboratorio.	91
3.1.2. Equipo	93
3.1.3. Material biológico.	93
3.1.4. Medios de cultivo.	95
3.1.5. Reactivos.	96
3.2. Métodos.	98
3.2.1. Aislamiento.	98
3.2.2. Identificación.	99
3.2.3. Conservación.	117

	Pags.
Capítulo 4. RESULTADOS.	121
Capítulo 5. DISCUSION DE RESULTADOS.	159
Capítulo 6. CONCLUSIONES.	164
ANEXOS	166
ANEXO 1. Medios de cultivo.	167
ANEXO 2. Reactivos.	191
Capítulo 7. BIBLIOGRAFIA.	196

I N T R O D U C C I O N

I N T R O D U C C I O N

El objetivo de este trabajo es la formación de una subcolección de bacilos grampositivos, de interés para los programas de la Facultad de Química, tanto de docencia como de investigación. Esta subcolección se conservará en el Cepario de la Facultad.

Para realizar este trabajo se partió de la obtención ó del aislamiento de los microorganismos, los cuales fueron -- después identificados, propagados y conservados por liofili- zación. Además se hizo el registro de la información refe- rente a los métodos y medios de cultivo, períodos de incuba- ción y conservación, que es útil para trabajos posteriores que incluyan a los miembros del amplio grupo que constituyen los bacilos grampositivos.

Las cepas de esta subcolección serán útiles para la ca- rrera del Q. F. B., ya que se podrán emplear en prácticas de Microbiología General, de Biosíntesis Microbiana de amplia- ción Industrial, de Fisiología y Bioquímica de Microorganis- mos, de Bacteriología Médica, etc., así como en trabajos de investigación Microbiológica, Industrial, Genética, Ecológi- ca, etc.

Se realizó una investigación bibliográfica de los bacilos grampositivos tratados, con el fin de describir tanto -- sus características morfológicas y bioquímicas como sus características de cultivo y patogénicas. Se incluye esta descripción para proporcionar el aspecto teórico de este trabajo, a la vez que material de discusión útil para las condiciones de los laboratorios a los cuales tienen acceso los estudiantes de esta Facultad, con el fin de ayudar a que estos microorganismos puedan ser estudiados correctamente dentro -- de nuestras posibilidades.

CAPITULO 1

G E N E R A L I D A D E S

1.1. BACILOS GRAMPOSITIVOS

En la actual clasificación de bacterias, existen bacilos grampositivos sólo en dos grupos (aparte de los actinomicetos) :

En la parte 15, a la que pertenecen los géneros Bacillus, Sporolactobacillus, Clostridium, Desulfotomaculum, Sporosarcina y Oscillospira.

~~Y en la parte 16, a la que pertenecen los géneros Lactobacillus, Listeria, Erysipelothrix y Caryophanon.~~

Para la realización de esta tesis, se trabajó con los géneros Bacillus y Clostridium de la parte 15 y con los géneros Lactobacillus y Listeria de la parte 16, ya que dentro de ellos se encuentran los microorganismos más representativos para los fines de este trabajo, es decir, microorganismos importantes desde el punto de vista didáctico.

Nota:

La información sobre los microorganismos presentada en este trabajo fue obtenida del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 8a. edición.

1.2. BACILOS GRAMPOSITIVOS ESPORULADOS

Células con forma de bastón. No producen micelio. Forman endosporas que difieren de las células vegetativas en -- que son más refringentes y menos susceptibles a la tinción, son más resistentes al calor y otros agentes destructores, y tienen un alto contenido de ácido dipicolínico. La espora -- se encuentra en el centro de la célula y está cubierta por -- una corteza de peptidoglicano y una envoltura externa.

Son móviles por flagelos peritricos o laterales, o no móviles.

Aeróbicos, facultativos o anaerobios.

1.2.1. GENERO I Bacillus

Células en forma de bastón que varían de 0.3 a 2.2 μm -- de ancho por 1.2 a 7.0 μm de largo.

La mayoría son móviles y poseen flagelo típicamente lateral. Forman endosporas resistentes al calor; sólo una en cada célula esporangial.

Reacción de Gram: positiva, o negativa sólo en temprano estado de crecimiento.

Son quimioorganótrofos, poseen un metabolismo estrictamente respiratorio, estrictamente fermentativo o ambos, dependiendo del sustrato. El aceptor terminal de electrones - en el metabolismo respiratorio es el oxígeno molecular, reemplazable en algunas especies por nitrato. La mayoría de las especies forman catalasa.

Dentro de este género, la mayoría de las especies no son patógenas. Bacillus anthracis es patógeno, produce el carbunco que es una enfermedad original de animales inferiores transmisible al hombre. Bacillus subtilis y Bacillus cereus son patógenos en casos especiales, como lo son pacientes inmunodeprimidos y lactantes en problemas gastrointestinales.

Las especies del género Bacillus se encuentran divididas arbitrariamente en dos grupos:

Grupo I: Comprenden 22 especies, las cuales se aceptan - como entidades distintas.

Grupo II: Contiene 26 especies, que han tenido un reconocimiento menos extenso.

Dentro de este género, trabajamos con las siguientes especies del Grupo I:

- Bacillus subtilis
- Bacillus pumilus
- Bacillus licheniformis
- Bacillus cereus
- Bacillus anthracis
- Bacillus megaterium
- Bacillus polymyxa
- Bacillus macerans
- Bacillus circulans
- Bacillus stearothermophilus
- Bacillus coagulans
- Bacillus firmus
- Bacillus sphaericus

GRUPO I

Bacillus subtilis

Sinónimos. Bacillus mesentericus, Bacillus vulgatus, Bacillus panis.

Morfología y Tinción.

Bacteria en forma de bastón, comunmente formando cadenas. Posee un flagelo lateral y endosporas de $0.8 \times 1.8 \mu\text{m}$
Grampositivo.

Características de Cultivo:

Las colonias formadas en medios con agar, son circulares o irregulares con superficie lisa y llegan a ser gruesas y opacas. Pueden ser rugosas y de color crema o café.

Las características de las colonias varían notablemente según la composición del medio.

Bioquímica del Microorganismo:

Posee un metabolismo aeróbico, con el oxígeno como el aceptor terminal de electrones. El medio mínimo para el crecimiento vegetativo no tiene vitaminas, contiene glucosa, citrato y una sal de amonio como únicas fuentes de carbono y nitrógeno.

En medios que contienen glucosa, la admisión del oxígeno

permite un crecimiento abundante, con la formación de 2-3-butenediol, acetona y CO_2 como productos principales.

Los pigmentos presentes en las colonias dependen de la composición del medio.

Licúa la gelatina nutritiva (22 °C), 1 cm. o más en un período comprendido de 1 a 7 días.

Los pigmentos se han identificado como: pulcherrimina o melaninas que colorean las colonias y se pueden difundir al medio adyacente a ellas.

La mayoría de las cepas pigmentadas forman colonias color café o rojo y algunas anaranjadas o negras, pero muchas carecen de pigmento.

Catalasa positiva, presenta glóbulos intracelulares que se tiñen con fucsina, los cuales no se observan en células que desarrollaron en agar glucosado. Produce ácido a partir de arabinosa, xilosa, y manitol. La prueba de reacción a la yema de huevo es negativa, no crece en 0.02% de azida, crece en 7% de cloruro de sodio y en caldo de dextrosa Sabouraud. Presenta un crecimiento variable de 0.001% de lisozima. Hidroliza la caseína. No descompone la tirosina. Reduce la leche tornasolada. No posee arginina dehidrolasa. Hemólisis variable. No produce lecitinasa. Produce antibióticos

polipeptídicos. Libera enzimas que poseen acción lítica sobre células bacterianas vivas.

El pH para el crecimiento activo es de 5.5 a 8.5

Crece en alimentos no ácidos si hay oxígeno disponible.

El contenido de G + C del DNA es de 42-43 moles %.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 1.

Bacillus subtilis var. niger.

Este bacilo forma un pigmento negro en medios que contienen tirosina. En ninguno de los medios la formación del pigmento es completamente estable.

Bacillus coagulans.

Sinónimos. Bacillus thermoacidurans, Bacillus dextralacticus

Morfología y Tinción

Bacilo que varía de 2.5 a 5 μ m de largo y de 0.6 a 1 μ m de ancho.

Posee espora con forma elíptica, que se encuentra en una posición que va de central a terminal. Tiene una variación morfológica considerable, ya que su morfología se encuentra entre la morfología característica del Grupo I (esporangio no hinchado apreciablemente, con esporas cilíndricas u ovales) y la morfología característica del Grupo II (esporangio hinchado con esporas ovales). Es móvil. Grampositivo.

Características del Cultivo:

Para la iniciación del crecimiento el pH óptimo requerido es mínimo de 4 y máximo de 6. Su temperatura de crecimiento es: máxima de 55 °C a 60 °C y mínima de 15 °C a 25 °C.

Bioquímica del Microorganismo:

Los requerimientos mínimos de cultivo son diversos varían según la cepa y la temperatura de cultivo. Dentro de los requerimientos se encuentran varios aminoácidos y vitaminas.

Los principales productos de la fermentación de la glucosa

sa son: ácido L (+)-láctico y pequeñas cantidades de 2, 3-butanediol, acetona, ácido acético y etanol. El pH final es de 4 a 5 pero varía según la cepa, medio y condiciones de cultivo.

Los azúcares fermentables incrementan la cantidad de crecimiento aeróbico sobre agar.

Puede crecer anaeróbicamente.

Una condición selectiva para el crecimiento vegetativo - es la presencia de un azúcar fermentable, un pH de 4.5 a 5.5 inicialmente y una incubación de 45 °C a 55 °C ya sea aeróbica o anaeróbicamente.

Se puede multiplicar en comidas ácidas, como lo es por ejemplo el jugo de tomate.

Hidroliza el almidón, no crece en 7% de cloruro de sodio, no desamina la fenilalanina.

El contenido de G + C del DNA reportado para 3 cepas se encuentra en un rango de 47 a 48 moles %.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 1.

Bacillus circulans.

Sinónimos. Bacillus amylolyticus, Bacillus closteroides.

Morfología y Tinción.

Bacilo que varía de 2 a 5 μ m de largo y de 0.5 a 0.7 μ m de ancho.

En la mayoría de las cepas la espora es terminal o sub-terminal. Si el bacilo es corto la espora es central, en un esporangio en forma de huso. Es poco móvil. Grampositivo.

Características del Cultivo:

Forma colonias delgadas en agar nutritivo y en algunas cepas hay dispersión activa y puede dar lugar a las llamadas "colonias móviles".

Su temperatura de crecimiento es: máxima de 35 °C a - - 50 °C y mínima de 5°C a 20 °C.

Bioquímica del Microorganismo:

Algunas cepas degradan débilmente a la celulosa. Su acción proteolítica sobre la gelatina nutritiva es débil o nula.

Dependiendo de la cepa serán los requerimientos del medio mínimo y su crecimiento en medio glucosado bajo condicio

nes de anaerobiosis.

Catalasa positiva. Produce ácido a partir de arabinosa, xilosa, y manitol; hidroliza el almidón; no produce indol; - no desamina la fenilalanina, no descompone la tirosina.

El contenido de G + C del DNA se ha reportado como de - 35 moles %, 47 moles % y 50 moles % en diferentes cepas.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 1.

Bacillus stearotherophilus.

Morfología y Tinción.

Bacilo que varía de 2 a 3.5 μ m de largo y de 0.6 a 1 μ m de ancho.

Posee espora con forma elíptica que se encuentra en posición terminal. Es móvil. Grampositivo.

Características del Cultivo:

Su temperatura de crecimiento es: máxima de 65°C a 75°C y mínima de 30°C a 45°C.

Bioquímica del Microorganismo:

Su carácter diagnóstico más distintivo es su capacidad de crecimiento a 65°C, su sensibilidad a la azida y una limitada tolerancia al ácido.

La mayoría de las cepas crecen activamente en medios con glucosa en ausencia de oxígeno hasta niveles de pH que van de 5.3 a 4.8.

Algunas cepas no crecen anaeróbicamente. Los productos de la fermentación anaeróbica son principalmente: ácido L(+)-láctico y pequeñas cantidades de ácido fórmico, ácido acético y etanol.

Para algunas cepas el nitrato mantiene el crecimiento anaeróbico, con producción de gas, otras no tienen acción sobre el nitrato o llegan a nitritos únicamente.

Los requerimientos para el medio mínimo varían según el tipo de fuente de carbono y nitrógeno que necesite la cepa -- además de ver también los factores de crecimiento, aminoácidos y vitaminas que requiera para su crecimiento.

Sus esporas son las más resistentes al calor dentro de este género, en contraste con las células vegetativas que -- son muy sensibles a condiciones desfavorables.

Hidroliza el almidón; no crece en 7% de cloruro de sodio, no desamina la fenilalanina.

El contenido de G + C del DNA se ha reportado en un rango de 49 a 53 moles % para 16 cepas y en un rango de 44 a 46 moles % para otras 3 cepas.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 1.

Bacillus macerans.

Sinónimos. Bacillus acetoethylicum, Aerobacillus acetoethylicus

Morfología y Tinción.

Bacilo que varía de 2.5 a 5 μ m de largo y de 0.5 a 0.7 μ m de ancho.

La superficie de la spora está marcada con arrugas longitudinales. Es móvil. Grampositivo.

Características del Cultivo:

Las colonias en agar nutritivo son delgadas y rodeadas por la extensión de la colonia. En agar glucosado son más opacas y no mucoides.

Su temperatura de crecimiento es: máxima de 40°C a 50°C y mínima de 5°C a 20°C.

Bioquímica del Microorganismo:

El medio mínimo para cepas típicas tiene una fuente energética de carbono, $\text{NH}_4\text{-N}$, biotina y tiamina.

Los productos de la fermentación de carbohidratos son: etanol, acetona, ácido fórmico, ácido acético, CO_2 e hidrógeno.

Descompone la pectina y los polisacáridos de tejidos ve getales. Su acción sobre la celulosa es débil ó nula.

La mayoría de las cepas fijan nitrógeno en condiciones de anaerobiosis.

El crecimiento en anaerobiosis es vigoroso cuando el me dio contiene azúcares fermentables.

Catalasa positiva. Produce ácido a partir de arabinosa, xilosa y manitol; hidroliza el almidón; no produce indol; no desamina la fenilalanina y no descompone la tirosina.

El contenido de G + C del DNA se ha reportado en un ran go de 49 a 51 moles %.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 1 .

Bacillus cereus.

Sinónimos. Bacillus mycoides, Bacillus anthracoides, Bacillus pseudoanthracis.

Morfología y Tinción.

Bacilo que varía de 3 a 5 μ m de largo y de 1 a 1.25 μ m de ancho. Sus extremos son cóncavos y algo hinchados. Es poco móvil.

La espora, cuando se libera del esporangio, está cubierta por una exospora, en la germinación ésta sufre una lisis rápida mientras va emergiendo la célula vegetativa.

El bacilo suele encontrarse formando cadenas. La estabilidad de las cadenas determina la forma de la colonia, la cual varía según las diferentes cepas. Grampositivo.

Características del Cultivo:

Las colonias tienen una apariencia lisa o de vidrio esmerado, con orillas onduladas. Las colonias forman una especie de raíces, las cuales se dispersan a gran distancia bajo la superficie del agar, se encuentran irregularmente enredadas y se presentan torcidas en sentido de las manecillas del reloj o al contrario, según la cepa de que se trate.

Su temperatura de crecimiento es: máxima de 35°C a 45°C y mínima de 10°C a 20°C .

Bioquímica del Microorganismo:

Fermenta la glucosa dando como productos principales, - el 2,3-butanediol, acetona, glicerol, ácido láctico, ácido succínico, ácido fórmico, ácido acético y CO₂ con variaciones determinadas por las condiciones de cultivo.

Entre los productos extracelulares se encuentran hemolisinas, toxina soluble (letal para el ratón), enzimas líticas, enzimas proteolíticas y fosfolipasa C .

En medios con almidón y suficiente hierro algunas cepas producen pigmento rojo de pulcherrimina. Algunas cepas producen un pigmento fluorescente amarillo-verde en varios medios. En agar nutritivo algunas cepas oscurecen ligeramente el medio y otras producen un pigmento difusible café-rosado.

Requiere indispensablemente de uno o varios aminoácidos según la cepa de que se trate. No requiere de vitaminas.

El crecimiento en anaerobiosis se realiza en medios complejos, promovido por la presencia de glucosa o nitrato.

El contenido de G + C del DNA se ha reportado en un ran

go de 32 a 37 moles % .

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 1 .

Bacillus megaterium.

Sinónimos. Bacillus tumescens, Bacillus oxalaticus, Bacillus ruminatus.

Morfología y Tinción.

En agar nutritivo las células presentan forma oval, cilíndrica o piriforme, con un diámetro aproximado de 1.5 μ ; tienden a formar cadenas cortas enrolladas. En medios con carbohidratos las células son más grandes y pueden alcanzar hasta 3 μ de diámetro o más en caso de algunas cepas. Es poco móvil.

Las esporas poseen una forma que varía de cortas y ovales a alargadas.

En algunas cepas la cubierta de la spora se tiñe con fucsina. Grampositivo.

Características del Cultivo:

En agar nutritivo crece de manera acumulada o dispersa, las colonias son lustrosas, moderadamente lisas y a veces ligeramente rugosas, al envejecer algunas toman un color amarillo y bajo una incubación larga pueden tomar un color café ó negro.

El crecimiento en medio con glucosa, es mucóide, Su -

temperatura de crecimiento es: máxima de 35°C a 45°C y mínima de 3°C a 20°C .

Bioquímica del Microorganismo:

La mayoría de las cepas son móviles, aunque su movilidad es lenta y requiere de aireación. Forma ácido a partir de arabinosa, xilosa y manitol.

Licúa activamente la gelatina nutritiva.

Digiere activamente la caseína. Desamina la fenilalanina. ~~Asimila nitratos sin producir acumulación de nitritos~~ en el medio.

Se multiplica sin factores de crecimiento, sobre una sal de amonio o nitrato y glucosa teniendo a estos compuestos como única fuente de nitrógeno y carbón.

Es aerobio.

Las esporas se forman en el suelo.

El contenido de G + C del DNA se ha reportado en un rango de 36 a 38 moles % .

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 1 .

Bacillus anthracis.

Sinónimo. Bacteridium anthracis.

Morfología y Tinción.

Bacilo que varía entre 4.5 y 10 μ m de largo y 1 a 1.25 μ m de ancho. Posee forma de bastón con extremos a veces cóncavos y algo hinchados, en forma de cadena, poseen aspecto parecido al de una vara de bambú nudoso. Su agrupación es variable, en el organismo enfermo se encuentran aislados, en pares o en cadenas cortas. En cultivos se encuentran formando cadenas largas. No es móvil.

Forma esporas que se observan como cuerpos refringentes libres ó alojados en el centro de la célula. Grampositivo.

Características del Cultivo.

Las colonias son de forma irregular y poseen una disposición ensortijada, presentan un aspecto conocido como " cabeza de medusa ".

En agar adicionado de 0.05 a 0.5 (g/ml.) unidades de penicilina, las células de cultivos jóvenes se observan grandes y esféricas. Estos cambios en las células se pueden apreciar en la superficie del agar, observándose como una serie de perlas.

Su temperatura de crecimiento es: máxima de 40°C y mínima de 15°C a 20°C .

Bioquímica del Microorganismo.

Este báculo es aerobio y facultativamente anaerobio. Requiere para su crecimiento tiamina y gran número de aminoácidos.

No causa hemólisis a las células de carnero en 24 horas.

La reacción a la yema de huevo es débil, raramente sigue más allá de la orilla de la colonia.

Las cepas virulentas de Bacillus anthracis forman una cápsula de glutamil-polipéptido durante su multiplicación in vivo, también forman cápsula en agar adicionado de bicarbonato bajo atmósfera de CO₂ teniendo entonces las colonias una consistencia mucoide.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 1 .

Bacillus licheniformis.

Sinónimos. Semiclostridium commune, Bacillus tinakiensis.

Morfología y Tinción.

Tiene forma de bastón, posee un flagelo lateral. Posee espora que varía su posición de ecuatorial a polar. Grampositivo.

Características del Cultivo.

Las colonias en medios con agar son opacas, con superficie que puede ser lisa o rugosa. Por lo general se fijan fuertemente al agar.

Su temperatura de crecimiento es: máxima de 50°C y mínima de 15°C .

Bioquímica del Microorganismo.

Licúa la gelatina nutritiva lentamente (22°C).

Fermenta anaeróbicamente la glucosa dando varios productos que son los más característicos.

En medios con carbohidratos que contienen suficiente hierro se forma un pigmento rojo. En cultivos viejos toman un color café.

La arginina dihidrolasa es positiva en la mayoría de --
los medios.

Puede inducirse la producción de penicilinasa.

Produce antibióticos polipeptídicos.

Un cultivo joven recientemente aislado, crece en medios con amoníaco como única fuente de nitrógeno en ausencia de -- factores de crecimiento.

El crecimiento anaeróbico ocurre en medios complejos -- que contienen glucosa o nitrato. Se produce CO_2 a partir de la glucosa, N_2 y N_2O a partir del nitrato.

Las esporas que se encuentran en el suelo, pueden sobre -- vivir al calor severo. El crecimiento vegetativo en muchos alimentos se ve favorecido a una temperatura de 30°C a 50°C .

El Contenido de G + C del DNA de varias cepas se ha re -- portado en un rango de 43 - 47 moles % .

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 1 .

Bacillus sphaericus.

Sinónimos. Bacillus fusiformis, Bacillus lactimorbi, Bacillus serositidis.

Morfología y Tinción.

Bacilo que mide de 1.5 a 5 μ m de largo y de 0.6 a 1.0 μ m de ancho. Es móvil.

La tinción de Gram es positiva en el 90% de las cepas y algunas de ellas tienen este carácter inconstante.

Características del Cultivo.

Crecen en agar nutritivo formando colonias compactas en la superficie del agar o dispersas bajo el mismo. Algunas cepas forman colonias de color rosa.

Su temperatura de crecimiento es: máxima de 30°C a 45°C y mínima de 5°C a 15°C .

Bioquímica del Microorganismo.

Es aerobio.

Tiene acción proteolítica sobre la gelatina nutritiva - (22°C).

Crece en hidrolizado de caseína y algunas cepas requie-

ren tiamina, solo o junto con biotina.

Forma esporas en el suelo.

Produce acetofina. No tiene acción sobre los nitratos. -
Descompone débilmente la caseína. Desamina la fenilalanina.

El contenido G + C del DNA se ha reportado de 37 a 43 -
moles % .

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas
en el cuadro No. 1 .

Bacillus firmus

Sinónimo. Bacillus imomarinus.

Morfología y Tinción.

Bacilo que mide de 1.2 a 4.0 μ m de largo y de 0.6 a 0.9 μ m de ancho. El 90% de las cepas son móviles. Grampe
sitivo.

Características del Cultivo.

Forma colonias circulares o de forma irregular, son den
sas y opacas y tienen un color crema.

Su temperatura de crecimiento es: máxima de 40°C a 45°C
y mínima de 5°C a 20°C .

Bioquímica del Microorganismo.

Produce ácido a partir de glucosa.

Crece en medios con valores de pH cercanos a 6.

Sus requerimientos nutricionales mínimos son: una mez--
cla de aminoácidos y biotina ó biotina junto con tiamina.

Produce ácido a partir de arabinosa, xilosa y manitol. -
Hidroliza el almidón. Reduce los nitratos a nitritos. Des-
compone débilmente la caseína y la tirosina.

Desamina la fenilalanina.

Se encuentra en el suelo.

El contenido de G + C del DNA es de 41 moles % .

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 1 .

Bacillus pumilus.

Morfología y Tinción.

Bacilo que mide de 2.0 a 3.0 μ m de largo y de 0.6 a 0.7 μ m de ancho. Posee un flagelo lateral y endosporas. - Grampositivo.

Características del Cultivo.

Las colonias de la mayoría de las cepas en agar nutritivo son lisas y pueden desarrollar un color amarillo pálido.

Su temperatura de crecimiento es: máxima de 45°C a 50°C y mínima de 5°C a 15°C .

Bioquímica del Microorganismo.

A partir de glucosa produce ácido, pero no gas. Produce acetofina. No produce hidrólisis del almidón. Hidroliza el hipurato. No reduce los nitratos a nitritos ni crece en agar anaeróbico.

Requiere de biotina para su crecimiento y algunas cepas requieren, además, aminoácidos.

Algunas de las características anteriores diferencian a este microorganismo de Bacillus subtilis ya que ni pruebas serológicas, ni los métodos de germinación de esporas, han proporcionado una separación confiable de las dos especies.

Poseen esporas que se encuentran en el suelo frecuentemente.

El contenido de G + C del DNA se ha reportado en un rango de 39 a 43 moles % .

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 1 .

Bacillus polymyxa.

Sinónimos. Granulobacter polymyxa, Aerobacillus polymyxa, -
Bacillus asterosporus.

Morfología y Tinción.

Bacilo que mide de 2 a 5 μ m de largo y de 0.6 a 0.8 μ m de ancho.

Posee esporas con forma elíptica que ocupan una posición que va de central a terminal, según la cepa. El 90 al 100% de las cepas son móviles. Grampositivo.

Características de Cultivo:

En agar nutritivo, las colonias son delgadas y de bordes irregulares. En agar glucosado las colonias crecen unas sobre otras, son mucoides y de superficie mate.

Su temperatura de crecimiento es: máxima de 35°C a 45°C y mínima de 5°C a 10°C.

Bioquímica del Microorganismo:

El medio mínimo para este microorganismo consiste en una fuente energética de carbón, $\text{NH}_4\text{-N}$ y biotina.

Las condiciones selectivas para su crecimiento son: una fuente de carbono (la lactosa es especialmente selectiva);

una fuente de nitrógeno como NH_4^+ ó N_2 , biotina o trazas de extracto de levadura; pH de 6 a 7; una temperatura de 30°C; sin presencia de oxígeno.

El crecimiento en anaerobiosis es vigoroso, siempre y cuando sea en presencia de un carbohidrato fermentable.

Fermenta la glucosa dando como principales productos, 2, 3 - butanodiol, etanol, CO_2 , e hidrógeno. También fermenta muchos carbohidratos, polioles y otras sustancias. Catalasa positivo. Produce ácido a partir de arabinosa, xilosa y manitol; hidroliza el almidón, no produce indol, no desamina la fenilalanina y no descompone la tirosina. Descompone la pectina y polisacáridos de tejidos vegetales. Su acción sobre la celulosa es débil ó nula. Forma levanas a partir de sacarosa. Fija nitrógeno bajo condiciones de anaerobiosis.

El contenido de G + C del DNA es de 43 a 46 moles % .

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 1 .

1.2.2. GENERO III Clostridium

Son bacilos usualmente móviles por medio de un flagelo peritrico. Algunos son inmóviles. Poseen esporas con forma ovoide a esférica que ensanchan al bacilo.

Grampositivo, al menos en las etapas tempranas de su crecimiento.

Quimioorganótrofos. Algunas especies son sacarolíticas, algunas proteolíticas y otras poseen ambas propiedades o ninguna.

Fermentan azúcares, polialcoholes, aminoácidos, ácidos orgánicos, purinas y otros compuestos orgánicos.

Algunas especies fijan nitrógeno. No reducen a los sulfatos.

La mayoría de las cepas son estrictamente anaerobias, aunque algunas crecen en presencia de oxígeno a la presión atmosférica. No producen catalasa.

Estos microorganismos, se encuentran en el suelo, en sedimentos de aguas marinas y aguas dulces y en el tracto intestinal humano y de otros animales.

El contenido de G + C del DNA varía de 23 a 43 moles %.

Este género, está dividido en cuatro grupos, en base a la posición de la espora y a la hidrólisis de la gelatina:

- Grupo I Posee espora subterminal y no hidroliza la gelatina.
- Grupo II Posee espora subterminal e hidroliza la gelatina.
- Grupo III Posee espora terminal y no hidroliza la gelatina.
- Grupo IV Posee espora terminal e hidroliza la gelatina.

De las especies que comprende el Grupo II, se trabajó con las siguientes:

Clostridium histolyticum

Clostridium novyi

Clostridium perfringens

Clostridium chauvoei

Clostridium septicum.

Estos microorganismos son patógenos para animales de laboratorio aunque también se encuentran en ciertas infecciones en el hombre.

Clostridium perfringens es patógeno para los animales y el hombre.

Clostridium chauvoei.

Sinónimo. Bacterium chauvoei.

Morfología y Tinción.

Bacilo recto, que mide de 1.6 a 3.4 μ m de largo y de 0.5 a 0.8 μ m de ancho. Es móvil ya que posee un flagelo peritrico.

Su espora es oval y se encuentra en posición subterminal.

Grampositivo. Se tiñe de manera irregular.

Características del Cultivo:

Forma colonias que miden de 1 a 3 mm. de diámetro, poseen forma circular, con bordes regulares, son traslúcidas, de color blanco grisáceo, mates o con superficie lustrosa.

En caldo nutritivo o en caldo de carne cocida tienen un crecimiento lento o moderado, no siendo así si estos caldos contienen un carbohidrato fermentable.

Su temperatura óptima de crecimiento es: 37°C.

Bioquímica del Microorganismo.

Los productos de fermentación incluyen, ácido acético,

ácido butírico y alcohol butílico.

No tiene acción sobre la leche.

Produce una toxina débil, patógena para el ratón y el -
cuyo.

Se ha encontrado en infecciones de ganado bovino, en he-
ces de este tipo de ganado, así como en heces de perros.

El contenido de G + C del DNA varía de 23 a 43 moles %.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas
en el cuadro No. 2 .

Clostridium septicum.

Sinónimos. Bacillus septicus, Vibrio septicus.

Morfología y Tinción.

Bacilo que mide de 3.1 a 14.1 μ m de largo y de 1.1 a 1.6 μ m de ancho. Es móvil ya que posee un flagelo peritrico.

Su espora tiene forma oval y está en posición subterminal.

Grampositivo.

Características del Cultivo.

Forma colonias de forma irregular que tienden a ser circulares, estas colonias miden de 1 a 5 mm de diámetro, son ligeramente elevadas, translúcidas grises, con superficie -- lustrosa y frecuentemente producen una extensión de la colonia (swarming)

En caldo nutritivo o en caldo de carne cocida tienen un crecimiento moderado. Tienen un crecimiento profuso si estos medios contienen un carbohidrato fermentable.

Su temperatura óptima de crecimiento es: 37°C .

Bioquímica del Microorganismo.

Los productos de fermentación incluyen: ácido acético, ácido butíricos y pequeñas cantidades de etil, isobutil y -butil alcoholes.

Coagula lentamente la leche. Algunas cepas reducen -- los nitratos.

El contenido de G + C del DNA varía de 23 a 43 moles -

7.

Sus características bioquímicas se encuentran resumi-- das en el cuadro No. 2 .

Clostridium novyi, tipo B.

Sinónimo. Bacillus novyi.

Morfología y Tinción.

Bacilo que mide de 4.7 a 22.5 μ m de largo y de 1.4 a 2.5 μ m de ancho. Posee espora oval que se encuentra en posición subterminal. Es móvil y posee un flagelo peritrico. Grampositivo.

Características de Cultivo.

~~Desarrolla colonias de forma irregular que miden de 1 a 3 mm de diámetro, son ligeramente elevadas, de color gris, translúcidas y con superficie lustrosa.~~

En caldo de carne cocida su crecimiento es moderado. Este crecimiento se ve favorecido en un caldo que contenga un carbohidrato fermentable. Su temperatura óptima de crecimiento es: 37°C.

Bioquímica del Microorganismo.

Los productos de fermentación incluyen mayores cantidades de ácido acético, ácido isobutírico, ácido isovalérico, con pequeñas cantidades de ácido propiónico, ácido isocaproico, alcohol etílico, propílico e isobutílico.

Algunas cepas digieren la leche lentamente.

La reducción de nitratos es variable, dependiendo del medio base. Produce toxinas alfa, beta, zeta y eta.

Se ha encontrado en infecciones tanto del hombre como de los animales.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 2 .

Clostridium histolyticum.

Sinónimos. Bacillus histolyticus, Weinbergillus histolyticus

Morfología y Tinción.

Bacilo recto que mide de 1.6 a 3.1 μ m de largo y de 0.6 a 1.0 μ m de ancho. Posee un movimiento lento por medio de un flagelo peritrico. Tiene espora con forma oval y que se encuentra en posición subterminal. Grampositivo.

Características del Cultivo:

Las colonias tienen forma irregular tendiendo a ser circulares; miden de 0.5 a 2.0 mm de diámetro, son convexas, transparentes a opacas dependiendo de la esporulación, son de color gris con superficie lustrosa.

Tiene un crecimiento abundante en caldo nutritivo y caldo de carne cocida, produciéndose turbidez uniforme y sedimentación grisáceo.

Su temperatura óptima de crecimiento 37°C

Bioquímica del Microorganismo.

A partir de medios con peptona y extracto de levadura el producto de fermentación principal es ácido acético.

Hidroliza el colágeno. Digiere la leche. Es aerotolerante pero no esporula en aerobiosis. Se ha encontrado en el suelo y en heridas.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 2 .

Clostridium perfringens.

Sinónimos. Bacillus perfringens, Bacterium welchii.

Morfología y Tinción.

Bacilo recto que mide de 3.0 a 9.0 μ m de largo y de 0.9 a 1.3 μ m de ancho. Posee espora oval que se encuentra en posición subterminal. Es inmóvil. Grampositivo.

Características del Cultivo.

Forma colonias que miden de 2 a 5 mm de diámetro, son circulares y ocasionalmente presentan bordes extendidos, son elevadas, de color amarillo grisáceo, translúcidas y con superficie lustrosa.

En caldo nutritivo su crecimiento es moderado. Este crecimiento se ve favorecido en un caldo que contenga un carbohidrato fermentable.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 45°C.

Bioquímica del Microorganismo.

Los productos de fermentación incluyen ácido acético, ácido butírico y butanol. Sólo pocas cepas producen acetilmetil-carbinol.

La reducción de nitratos es variable, dependiendo del medio base. Produce fermentación violenta de la leche.

Forma 5 tipos de toxinas: A, B, C, D y E, las cuales se distinguen en base a su mayor toxicidad.

Se ha encontrado en el suelo, sedimentos marinos, heridas y heces.

El contenido de G+C del DNA es de 24 a 27 moles %.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 2 .

PARTE 16

1.3. BACILOS GRAMPOSITIVOS NO ESPORULADOS

Son bacilos en forma de bastones rectos o curvo, que se encuentran aislados o en cadenas. La mayoría no son móviles.

Grampositivos.

Son anaerobios o facultativos. Poseen requerimientos nutricionales orgánicos complejos. Son altamente sacaroclásticos. Por lo menos la mitad de los productos finales carbonados del metabolismo de carbohidratos están representados por el lactato. El lactato no es utilizado anaeróbiamente. Son catalasa negativos. Dan la reacción de benzidina negativa. Generalmente no son patógenos. Se encuentran en productos fermentados tanto de origen animal como vegetal en los cuales los carbohidratos son accesibles, también están en la boca y el tracto vaginal e intestinal de animales de sangre caliente, incluyendo al hombre.

De los géneros que comprende la familia Lactobacillaceae se trabajo con Lactobacillus y Listeria, dentro de los cuales se encuentran las siguientes especies:

Lactobacillus:
Lactobacillus delbrueckii.
Lactobacillus leichmannii.
Lactobacillus bulgaricus.

Lactobacillus casei.

Lactobacillus plantarum.

Listeria:

Listeria monocytogenes.

1.3.1. G E N E R O I

Lactobacillus

Son bacilos cuya apariencia varía de largos y delgados a cortos cocobacilos.

Se encuentran formando cadenas, sobre todo en la última parte de la fase logarítmica de crecimiento. La mayoría son inmóviles y cuando son móviles tienen un flagelo peritrico. No tienen esporas. Grampositivo.

~~Algunas cepas muestran cuerpos bipolares o granulaciones internas que se observan mediante la tinción de Gram o con una tinción con azul de metileno.~~

Poseen un metabolismo fermentativo, aunque crecen en presencia de oxígeno. Algunas cepas son anaerobias estrictas en el aislamiento.

Son sacaroclásticos; Fermentan la glucosa, disminuyendo el pH a 1.

Por lo menos la mitad de los productos carbonados obtenidos en la fermentación, están representados por el lactato, el cual no es fermentado; son productos adicionales; -- acetato, formato, succinato, CO₂ y etanol; no se producen -

ácidos volátiles con más de dos átomos de carbono.

Generalmente no reducen los nitratos y cuando lo hacen es porque existe un pH final alrededor de 6.

No licúan la gelatina. No digieren la caseína.

No producen indol ni ácido sulfhídrico.

Son catalasa negativos, sin embargo, algunas cepas descomponen el peróxido por medio de una pseudocatalasa.

Dan negativa la reacción de la benzidina.

Es rara la producción de pigmento y si lo hay es de color amarillo o anaranjado.

Los requerimientos nutricionales son característicos para cada especie.

El crecimiento en medios sólidos es mejor en anaerobiosis más 5 a 10 % de CO₂. Su temperatura óptima es de 30°C a 40°C.

El pH óptimo es de 5.5 a 5.8 .

Se encuentran en productos lácteos, granos, productos que contengan carne, agua, aguas negras, cerveza, vino, frutas, encurtidos de vegetales, levaduras y malta. También están en la boca, tracto intestinal, vagina de animales homotérmicos, incluyendo al hombre.

Generalmente no son patógenos.

El contenido de G + C del DNA se encuentran en un rango de 34.7 ± 1.4 a 53.4 ± 0.5 moles % .

Lactobacillus plantarum.

Sinónimos. Streptobacterium plantarum, Lactobacillus plantari

Morfología y Tinción.

Bacilo con forma de bastón, tiene extremos redondeados o rectos; miden de 3 a 8 μ m de largo y de 0.9 a 1.2 μ m de ancho. Se encuentra aislado, en pares o en cadenas cortas. Es móvil; algunas cepas poseen un flagelo peritrico. Grampositivo.

Características de Cultivo.

En condiciones de anaerobiosis, las colonias formadas miden aproximadamente 3 mm de diámetro, son elevadas, circulares, lisas compactas, de color blanco aunque a veces presentan un color amarillo.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C a 35°C.

Bioquímica del Microorganismo.

Fermenta el α -metil-D-glucósido y la melezitosa; algunas cepas fermentan el α -metil-D-manósido; otras fermentan la arabinosa y la xilosa conociéndose con el nombre de Lactobacillus arabinosus y Lactobacillus pentosus. (5)

Produce ácido DL-láctico. Presenta la fructosa 1,6-di-

fosfato aldolasa.

Crece en presencia de gluconato, con producción de CO_2 .

Fermenta la ribosa a una mol de ácido láctico y una mol de ácido acético.

Algunas cepas reducen los nitratos si el pH es de 6 o más elevado.

Crece en medios que contienen 4% de taurocolato de sodio.

Acidifica la leche y puede coagular la leche; produce de 0.3 a 1.2 % de ácido titrable.

Requiere pantotenato de calcio y niacina; a veces requiere riboflavina.

El contenido de G + C del DNA de 6 cepas es de 45 ± 1 moles %.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 3.

Lactobacillus casei.

Sinónimos. Caseobacterium vulgare, Streptobacterium casei.

Morfología y Tinción.

Bacilo que puede ser corto o largo, mide menos de -- 1.5 μ m de ancho, sus extremos tienen forma cuadrada y tiende a formar cadenas. Es inmóvil. Grampositivo.

Características del Cultivo.

Forma colonias lisas, con forma de diamante o de una -- lente, tienen color blanco o amarillo claro.

En caldo producen mucha turbidez.

Su temperatura óptima de crecimiento es: 37°C.

Bioquímica del Microorganismo.

Fermenta el sorbitol y la sorbosa. Fermenta lentamente o no fermenta la maltosa y la sacarosa.

No tiene acción sobre el glicógeno ni sobre el almidón.

Produce ácido L (+)-láctico. Presenta la fructosa 1,6-difosfato-aldolasa.

Fermenta la ribosa dando como productos: ácido láctico

y ácido acético, sin producción de CO_2 . Se puede inducir un crecimiento rápido y abundante con 4% de gluconato habiendo entonces producción de CO_2 .

No forma amoniaco a partir de arginina.

Requiere riboflavina, ácido fólico, pantotenato de calcio, niacina, piridoxal o piridoxamina.

Rogosa le reconoció 3 subespecies que crecen a 15°C y a veces hasta a 6°C .

Sus diferencias son:

Microorganismos	Crecimiento a 45°C	Fermentación de la lactosa	Fermentación de la ramnosa
L. casei subespecie casei	-	+	-
L. casei subespecie alactosus	-	-	-
L. casei subespecie rhamnosus	+	+	+

El 90% de las cepas de estas subespecies, crecen a expensas del piruvato y lo fermentan.

El contenido de G + C del DNA de 7 cepas es de 46.4 ± 0.8 moles %.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 3.

Lactobacillus delbrueckii.

Sinónimos. Bacillus acidificans, Thermobacterium cereale, Ulvina delbrücki.

Morfología y Tinción.

Bacilo con forma de bastón, que mide de 1 a 2 μ m de largo y de 0.5 a 0.8 μ m de ancho. Sus extremos son redondeados y se encuentra aislado o en cadenas cortas. Con una tinción con azul de metileno se observan granulaciones internas. Es inmóvil. Grampositivo.

Características del Cultivo.

Forma colonias rugosas y sin pigmento.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 35°C a 40°C .

Bioquímica del Microorganismo.

Forma ácido a partir de glucosa, sin producción de gas.-

Fermenta otros carbohidratos como la maltosa.

Produce homofermentativamente ácido D (-) Láctico.

Forma amoníaco a partir de arginina.

No produce acidez en la leche.

Requiere para su crecimiento pantotenato de calcio, niacina y riboflavina, algunas cepas requieren timidina.

Se encuentra en malta de granos y legumbres (papa principalmente) en fermentación a más de 41°C .

El contenido de G + C del DNA es de 50 moles %.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 3 .

Lactobacillus leichmannii.

Sinónimos. Bacillus leichmannii, Bacterium leichmannii.

Morfología y Tinción.

Bacilo con forma de bastón, que posee extremos redondeados, que miden de 2 a 4 μ m de largo y 0.6 μ m de ancho. Se encuentran aislado o en cadenas cortas. Se observan granulos cuando se somete a un tinción con azul de metileno. Es inmóvil. Grampositivo.

Características del Cultivo.

~~Forma colonias rugosas y sin pigmento.~~

Su temperatura óptima de crecimiento es de 35°C a 40°C.

Bioquímica del Microorganismo.

Produce homofermentativamente ácido D (-)-láctico.

Produce amoníaco a partir de arginina.

No acidifica la leche, pero fermenta la lactosa en --- otros medios adecuados.

~~Tiene una nutrición compleja, requiere pantotenato de - calcio, niacina, ácido fólico y vitamina B₁₂.~~

El contenido de G + C del DNA es de 50.8 \pm 0.5 moles %.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 3.

Lactobacillus bulgaricus.

Sinónimo. Thermobacterium bulgaricum, Lactobacillus longus.

Morfología y Tinción.

En cuanto a morfología es indistinguible de Lactobacillus lactis. Bacilo con forma de bastón que mide menos de 2 μ m de ancho. Se encuentra aislado ó formando pares. Presenta granulaciones que se revelan mediante una tinción con azul de metileno. Es inmóvil. Grampositivo.

Características del Cultivo.

Generalmente su colonias son rugosas y miden de 1 a 3mm de diámetro, poseen color blanco o gris claro.

Su temperatura óptima de crecimiento es :45°C .

Bioquímica del Microorganismo.

En leche produce ácido D(-)láctico. No produce amoníaco a partir de arginina.

Requiere para su crecimiento pantotenato de calcio, niacina y riboflavina, algunas cepas además requieren vitamina B₁₂ .

Lactobacillus bulgaricus se diferencia de Lactobacillus lactis en que éste último fermenta la trealosa, sacarosa, --

salicina, manosa y maltosa y Lactobacillus bulgaricus no los fermenta.

El contenido de G + C del DNA se encuentra alrededor de 50.3 ± 1.4 moles % .

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 3.

1.3.2. GÉNERO : Listeria

Bacilos Grampositivos, pequeños, cocoïdes, que forman cadenas de 3 a 5 o más células. Producen formas filamentosas alargadas en su estado rugoso.

En tinciones de colonias viejas muestran un arreglo típico de difteroides en empalizada con pocas formas en V o Y. No produce espora ni cápsula; no es ácido-resistente.

Es móvil por poseer flagelos peritricos cuando crece entre 20°C y 25°C. A 37°C generalmente tiene solo un flagelo polar, ocasionalmente presenta de dos a cuatro y a veces ninguno.

Forma ácido a partir de glucosa y otros carbohidratos sin producción de gas.

Hidroliza la esculina.

No produce Indol. No hidroliza la urea, la caseína, la gelatina ni la leche.

Usualmente es catalasa positivo.

Es aerobio a microaerofílico (aumenta su crecimiento bajo condiciones de reducción oxígeno y con 5 a 10% de CO₂).

Crece entre 4°C y 38°C particularmente cuando el medio

contiene glucosa.

Es resistente a la polimixina B.

Se ha encontrado en heces de animales y del hombre, en vegetales.

Parasita a organismos poiquilotérmicos y a animales de sangre caliente incluyendo al hombre.

El contenido de G + C del DNA es de 38 moles % excepto para Listeria denitrificans cuyo contenido es de 56 moles %

Listeria monocytogenes.

Sinónimos. Bacterium monocytogenes, Listerella hepatolytica

Morfología y Tinción.

Bacilo con forma cocoide, que mide de 0.5 a 2 μ m de largo y de 0.4 a 0.5 μ m de ancho, tiene extremos redondeados. Se encuentra aislado, en pares paralelos o en forma de V.

En cultivos sólidos el bacilo se observa alargado. Es móvil por medio de cuatro flagelos peritricos (20°C a 25°C). A 37°C se presentan pocos flagelados. Grampositivo.

Características del Cultivo.

En medio semisólido que contiene 0.25 % de agar, 8 % de gelatina y 1 % de glucosa, crece a lo largo de la picadura - en 24 horas a 37°C, de manera irregular, con extensiones nublosas; crece extendiéndose lentamente a través de todo el medio.

Cuando alcanza su máximo crecimiento aparece una zona - con forma de sombrilla 3 a 5 mm debajo de la superficie.

En agar de extracto de hígado forma colonias circulares, lisas, butiráceas, poco aplanadas y translúcidas.

Puede formar colonias lisas, intermedias y rugosas.

Presenta un crecimiento bueno en agar sangre con una zona de hemólisis estrecha alrededor de las colonias. Algunas cepas son fuertemente hemolíticas.

Bioquímica del Microorganismo.

Algunas cepas fermentan: D-galactosa, melezitosa y ramosa. Otras producen ácido lentamente (3 a 7 días) a partir de lactosa y sacarosa.

El producto principal de las fermentaciones es el ácido láctico. Los cultivos tienen un penetrante olor ácido.

Produce acetona. No produce sulfuro de hidrógeno y no reduce los nitratos a nitritos.

Requiere para su crecimiento biotina, riboflavina, tiamina, ácido tiorctico, cistefna, glutamina, isoleucina, leucina, valina y otros aminoácidos.

Estimulan su crecimiento la arginina, histidina, metionina y triptofano.

Hidroliza al Tween 80 y al Tween 20.

Es sensible a la tetraciclina, cloramfenicol, eritromi-

cina, ampicilina, neomicina y otros antibióticos. Es menos sensible a la penicilina y a las sulfonamidas. Es resistente a polimixina B.

El contenido de G + C del DNA es de 38 moles %.

Características Biológicas.

La inyección intravenosa o intraperitoneal de cultivos en conejos, produce un marcado aumento de monocitos circulantes en la sangre. La infección se presenta como zonas necróticas o granulomatosas en varios órganos. Causa queratitis conjuntival cuando se inocula en la conjuntiva del conejo.

Está ampliamente distribuido en la naturaleza. Se ha encontrado en insectos, aguas negras, suelo, abono materia vegetal podrida, en heces de animales y del hombre; en infecciones de órganos, en sangre y en fluido cerebroespinal del hombre, de animales de sangre caliente y poiquilotérmicos.

Causa meningitis, encefalitis, septicemia, endocarditis, aborto, abscesos y lesiones locales purulentas.

Sus características bioquímicas se encuentran resumidas en el cuadro No. 4.

**1.4. CUADROS COMPARATIVOS DE CARACTERISTICAS
BIOQUIMICAS DE LOS GENEROS MENCIONADOS**

Cuadro Comparativo de Bioquímicas del género Bacillus

	Acido a partir de Arabinosa	Gas a partir de Arabinosa	Acido a partir de Xilosa	Gas a partir de Xilosa	Acido a partir de Manitol	Gas a partir de Manitol	Acido a partir de glucosa	Gas a partir de glucosa	Acetoina a partir de glucosa	Movilidad	Indol	Reducción de Nitratos	Catalasa	Hidrólisis de Almidón	Hidrólisis de Gelatina	Hidrólisis de Hipurato	Crecimiento en 5% de NaCl	Crecimiento en 7% de NaCl	Crecimiento en agar anaeróbico
<u>B. subtilis</u>	+		+		+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. licheniformis</u>	+		+		+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. anthracis</u>	+		+		+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. megaterium</u>	d		d		d		+	+	+	d		d	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. cereus</u>	+		+		+		+	+	+	d		+	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. macerans</u>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. circulans</u>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	d	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. stearothermophilus</u>	d		d		d		+	+	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+
<u>B. coagulans</u>	d		d		d		+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. pumilus</u>	+		+		+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. firmus</u>	d		d		+		+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. sphaericus</u>	+		+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>B. polymyxa</u>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

d= reacción variable, positiva del 11 al 89% de las cepas

w= positivo débil

Cuadro Comparativo de Bioquímicas del género Clostridium

	<u>Cl. chauvoei</u>	<u>Cl. septicum</u>	<u>Cl. novyi tipo B</u>	<u>Cl. perfringens</u>
Manosa	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+
Salicina	-	v	-	d
Lactosa	+	+	-	+
Glucosa	+	+	+	+
Inositol	-	-	+	+
Sacarosa	+	-	-	+
Almidón	-	-	-	+
Reducción de Nitratos	+	v	v	d
Hidrólisis de la Gelatina	+	+	+	+
Catalasa	-	-	-	-
Acido Sulfhídrico	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	-
Acetoina	-	-	-	d
Hidrólisis de Urea	-	-	-	d

v= variable
d= reacción variable, positiva del 11 al 89% de las cepas.

CUADRO No. 3
Cuadro Comparativo de Bacterias del género *Lactobacillus*

	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. leichmannii</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. arabinosus</i> ^a	<i>L. bulgaricus</i>
Esculina	-	+	+	+	+	-
Rafinosa	-	-	-	+	+	+
Ramnosa	-	-	*	-	-	-
Sorbitol	-	-	+	+	+	-
Melezitosa	-	-	+	v	v	-
Galactosa	v	v	+	+	+	+
Amigdalina	-	+	+	+	+	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Celobiosa	-	+	+	+	+	-
Xilosa	-	-	-	v	v	-
Ribosa	-	-	+	+	+	-
Trealosa	-	+	+	+	+	-
Lactosa	-	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+	-
Fructosa	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	v	+	+	-
Manitol	-	-	+	+	+	-
Hidrólisis de la Gelatina	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-
Acido Sulphídrico	-	-	-	-	-	-
Reducción de Nitratos	v	v	v	v	v	v
Metabolismo	f	f	f	f	f	f

v= variable

f= fermentativo

. = Excepto *L. casei* var. *alactosus*

* = Es + para *L. casei* var. *ramnosus*

a = Produce ácido a partir de arabinosa.

CUADRO No. 4

Cuadro de Bioquímicas de Listeria monocytogenes

Maltosa	+	
Glucosa	+	
Sacarosa	v	
Manitol	-	
Lactosa	v	
Xilosa	-	
Trealosa	+	
Salicina	+	
Esculina	+	
Reducción de Nitratos	-	
Descomposición de la Urea	-	
Hidrólisis de la Gelatina	-	
Hidrólisis del Almidón	+	
Catalasa	+	
Movilidad	+	
Hemolisis-Beta	+	
Metabolismo	ox	
Acido sulfhidrico	-	

v= variable.
ox= oxidativo

CAPITULO 2
APLICACION A LA ENSEÑANZA

Siendo el propósito de esta tesis formar una subcolección de bacilos Grampositivos para la enseñanza, sus aplicaciones inmediatas serán en prácticas en las que se requieran las características de morfología y bioquímicas que presentan los microorganismos estudiados.

Los bacilos Grampositivos constituyen un grupo muy interesante dentro de la Bacteriología, tanto por sus caracteres morfológicos y bioquímicos, como por sus aplicaciones en la industria alimentaria y por su importancia médica.

En las materias de Microbiología de la carrera de Q.F.B. como son Microbiología General, Bacteriología Médica, Fisiología y Bioquímica de Microorganismos, Microbiología de Alimentos, Biosíntesis Microbiana de Aplicación Industrial, Análisis Clínicos Bacteriológicos e Inmunología, se pueden utilizar estos microorganismos para pruebas comparativas de identificación, para la elaboración de proyectos en los que el alumno aplica los conocimientos adquiridos a través de la carrera, así como para proporcionar nuevos datos sobre el comportamiento bioquímico del microorganismo no notificados en la literatura.

Así, cada uno de estos microorganismos constituyen un útil con el cual maestros y alumnos pueden estudiar infinidad de perspectivas para completar y mejorar la enseñanza en

el laboratorio de Microbiología.

La existencia de esta subcolección de bacilos Grampositivos puede estimular al estudiante, despertando su interés en este tipo de microorganismos ya que algunos, por la dificultad que presentan para su aislamiento, identificación y condiciones de cultivo, son poco "atractivos" para ahondar en su estudio.

La utilidad de esta subcolección no sólo se circunscribe a la Facultad de Química. Algunas de estas cepas se han proporcionado ya, aún antes de terminar el trabajo, a otras dependencias, como la Facultad de Medicina, la Facultad de Ciencias (Biología) y el Instituto de Investigaciones Biomédicas, donde cada día se da un paso más en las investigaciones microbiológicas y en la formación de nuevas generaciones de investigadores; otras instituciones educativas ó algunas industrias también podrán utilizarlas con el fin de aprovechar las cualidades de estos microorganismos para el bien de nuestra gente, de nuestro país y de nuestro mundo.

Las bacterias que constituyen esta subcolección de bacilos Grampositivos, pueden emplearse en la realización de prácticas de laboratorio en materias de las carreras de Q.F.B., Químico e Ingeniero Químico, impartidas en la Facultad de Química de la UNAM; además también pueden usarse en diversos trabajos de investigación en Microbiología.

A continuación se presenta una lista de las materias en las cuales podemos emplear las bacterias de esta subcolección, indicando el uso posible de cada microorganismo.

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO;

Orientación : Bioquímico Microbiológica

1) Análisis Clínico Bacteriológicos

Cl. perfringens

Cl. novyi

Cl. septicum

Cl. histolyticum

Identificación de bacterias anaerobias patógenas.

Bacillus anthracis

Identificación microscópica

Listeria monocytogenes

Identificación (para posibles casos de listeriosis)

2) Bacteriología Médica

Bacillus sp.

Identificación del género. -

Clostridium sp.

Para observar la posición de la espora.

3) Biosíntesis Microbiana de Aplicación Industrial

B. subtilis

Producción de amilasas y proteasas.

B. licheniformis

Producción de bacitracina.

L. plantarum

L. delbrueckii

Fermentación láctica.

L. bulgaricus

L. casei

4) Fisiología y Bioquímica de Microorganismos

L. plantarum ————— Valoración de vitaminas -
por métodos microbiológicos.

5) Inmunología General e Inmunología Aplicada

B. subtilis ————— Durante la Obtención de -
vacunas como un control -
en pruebas de esterilidad
bacteriana.

L. monocytogenes ————— Producción de suero anti-
listeria.

6) Microbiología Agrícola

B. cereus

B. megaterium ————— Movilización de fósforo -
en el suelo

B. cirulans

7) Microbiología General

B. subtilis ó ————— Tinción de Gram., tinción
de esporas. Técnicas de -
Bacillus sp. ————— aislamiento y siembra. Es

Clostridium sp. ————— Morfología bacteriana --
Tinción de espora. Cultivo
de bacterias anaerobias

Lactobacillus sp. ————— Valoración de vitaminas.

Orientación : Farmacia

1) Microbiología Farmacéutica

B. subtilis ó _____ Tinciones. Técnicas de --
aislamiento y siembra. Es-
Bacillus sp tudio de cultivos puros.

Clostridium sp. _____ Tinciones. Estudio de mor-
fología bacteriana. Culti-
tivo de bacterias anaero-
bias.

Lactobacillus sp. _____ Valoración de vitaminas.

2) Inmunología

B. subtilis _____ Durante la obtención de -
vacunas como un control -
en pruebas de esterilidad
bacteriana.

L. monocytogenes _____ Producción de suero anti-
listeria.

Orientación : Tecnología de Alimentos

1) Microbiología de Alimentos

B. Subtilis ó _____ Tinciones. Técnicas de --
aislamiento y siembra. Es-
Bacillus sp. tudio de cultivos puros.

Clostridium sp. _____ Tinciones. Estudio de mor-
fología bacteriana. Culti-
vo de bacterias anaerobias

Lactobacillus sp. _____ Valoración de vitaminas.

2) Fermentaciones Industriales

Lactobacillus sp. _____ Fermentaciones lácticas

INGENIERO QUIMICO

1) Microbiología Industrial

- L. casei ————— Morfología
- B. stearothermophilus ————— Comprobación de efectividad en la esterilización.
- L. delbrueckii ————— Producción de ácido láctico.

QUIMICO

1) Microbiología I y II

- B. subtilis ó ————— Tinciones. Técnicas de aislamiento y siembra. Estudio de cultivos puros.
- Bacillus sp.
-
- Clostridium sp. ————— Tinciones. Estudio de morfología bacteriana. Cultivo de bacterias anaerobias.
- Lactobacillus sp. ————— Valoración de vitaminas.

CAPITULO 3
PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAL**3.1.1. Material de laboratorio.**

Agitadores de vidrio

Algodón

Ampolletas Pyrex

Anillo

Asa bacteriológica

Cajas de Petri

Cilindros metálicos

Desecador

Embudos

Espátulas

Etiquetas

Frascos para liofilizadora de 250 ml.

Gasa

Gradillas

Jarra de anaerobiosis

Matraces de bola de 500 ml.

Matraces de bola de 1 000 ml.

Matraces de bola de 2 000 ml.

Matraces Erlenmeyer de 100 ml.

Matraces Erlenmeyer de 250 ml.

Matraces Erlenmeyer de 500 ml.

Matraces Erlenmeyer de 1 000 ml.

Mechero Bunsen

Papel aluminio**Pinzas****Pinzas de Mohr****Pipetas graduadas de 1 ml.****Pipetas graduadas de 5 ml.****Pipetas graduadas de 10 ml.****Pipetas Pasteur****Pipetero****Portaasa****Portaobjetos****Probetas de 100 ml.****Probetas de 250 ml.****Recipiente para hielo seco****Soporte universal.****Tela de alambre****Tripie****Tubos de ensayo****Tubos de ensayo de 12 x 75****Tubos de ensayo de 13 x 100****Tubos de ensayo de 16 x 150****Tubos de ensayo de 22 x 175****Tubos de ensayo con tapón de rosca de 18 x 100****Tubos de ensayo con tapón de rosca de 16 x 150****Tubos de ensayo con tapón de rosca de 22 x 175****Vasos de precipitados de 250 ml.****Vasos de precipitados de 300 ml.**

3.1.2. Equipo

Agitador

Autoclave

Balanza analítica

Balanza granataria

Baño de temperatura controlada

Campanas de flujo laminar

Horno

Incubadora de 37°C

Incubadora de 42°C

Lámpara de luz ultravioleta

Liofilizadora LABCONCO

Microscopio

Refrigerador

Soplete de oxígeno.

3.1.3. Muestras (Material biológico)

A continuación se indica la forma en que se obtuvieron las cepas de esta subcolección; sólo se aislaron las que no pudieron obtenerse puras, pero cabe señalar que varias de las cepas obtenidas en otras instituciones presentaban contaminaciones, por lo que tuvieron que re-aislarse.

A partir de suelo Bacillus firmus
Bacillus pumilus

A partir de almejas — Clostridium perfringens.

A partir de Yakult — Lactobacillus casei var. rham-
nosus

A partir de Synerlac — Lactobacillus casei

Bacillus subtilis ATCC 6051

Bacillus licheniformis ATCC 9259

Bacillus licheniformis ATCC 9945

Bacillus licheniformis ATCC 9980

Bacillus cereus ATCC 11778

— Bacillus anthracis

Bacillus megaterium ATCC 10778

Bacillus polymyxa

Bacillus macerans ATCC 8309

Bacillus circulans ATCC 9966

Bacillus stearothermophilus

Bacillus coagulans

Donadas de otras
Instituciones

Bacillus sphaericus ATCC 4978

Clostridium histolyticum

Clostridium novyi

Clostridium chauvoei

Clostridium septicum

Clostridium septicum BMB 59

Lactobacillus plantarum ATCC8014

Lactobacillus delbrueckii

Lactobacillus leichmannii

Lactobacillus bulgaricus

Lactobacillus arabinosus

Listeria monocytogenes

Bacillus megaterium

Bacillus subtilis

Ya se encontraban
en el Cepario de
la Facultad de --
Química

Bacillus cereus

Bacillus subtilis var. niger

Bacillus circulans

Lactobacillus plantarum.

3.1.4. MEDIOS DE CULTIVO

- 1.- Agua peptonada
- 2.- Almidón agar
- 3.- Anaeróbico agar
- 4.- AOAC agar.
- 5.- Arginina caldo de
- 6.- Carbohidratos medio base para
- 7.- Carne levadura medio de
- 8.- Cistina tripticaseína medio de
- 9.- Citrato de Simmons agar
- 10.- Clostridium agar selectivo para
- 11.- Dextrosa sobouraud caldo
- 12.- Fenilalanina medio de
- 13.- Gelatina nutritiva
- 14.- Gelatina tioglicolato medio de
- 15.- Glucosa fosfato caldo de
- 16.- Indol nitrito medio de
- 17.- Infusión cerebro corazón caldo
- 18.- Infusión cerebro corazón agar
- 19.- Hipurato de sodio caldo de
- 20.- Jugo de tomate agar
- 21.- Leche descremada
- 22.- Leche tornasol
- 23.- Lee medio de
- 24.- Medio 1
- 25.- Microinóculo agar

- 26.- Microinóculo caldo
- 27.- MRS medio de
- 28.- Nitritivo agar
- 29.- Nutritivo caldo
- 30.- Oxidación - Fermentación medio basal de
- 31.- Sangre base de agar
- 32.- SIM medio de cultivo
- 33.- Soya tripticaseína agar de
- 34.- Solución salina isotónica
- 35.- Tioglicolato de Brewer medio de
- 36.- Tioglicolato 135-C medio de
- 37.- Tioglicolato medio líquido de
- 38.- ~~Tioglicolato sin dextrosa y sin indicador medio de~~
- 39.- Tripticaseína base de agar
- 40.- Urea base de agar

3.1.5. Reactivos

Aceite de inmersión

Aceite mineral

Acetona

Acido acético

Acido clorhídrico

Acido Sulfanílico

Agua destilada

Alcohol etílico

Alfa - naftilamina

Alfa - naftol
Amigdalina
Arabinosa
Bacto-agar
Carbonato de calcio
Celobiosa
Cloruro de sodio
Cloruro férrico
Cloruro mercúrico
CO₂ en forma de hielo seco
Cristal violeta
Esculina
Fenilalanina
Fenol
Fructosa
Galactosa
Glucosa
Hidróxido de potasio
Hipurato de sodio
Lactosa
Maltosa
Manitol
Melezitosa
Nigrosina
Nitrate de potasio
Oxalato de amonio
p-dimetilaminobenzaldehido
Peróxido de hidrógeno

Rafinosa
Ramnosa
Ribosa
Sacarosa
Safranina
Salicina
Sorbitol
Sulfato de neomicina
Sulfato de polimixina
Sulfito de sodio
Trealosa
Urea
Xilosa
Yodo
Yoduro de potasio

3.2. M E T O D O S

Las etapas experimentales de esta tesis son las siguientes:

- 1.- Aislamiento
- 2.- Identificación.
- 3.- Conservación.

2.1. Aislamiento

Para el aislamiento de los microorganismos se utilizó

la técnica de estrias en placa de agar, con la muestra total ó precedida de diluciones o de calentamiento para aislar microorganismos termorresistentes.

2.1.1. Siembra por estrias en placas de agar.

Este procedimiento se usó principalmente para obtener cultivos puros de muestras que contiene flora mixta.

La superficie del agar deber ser suave y húmeda, sin que esta humedad sea excesiva ya que esto podría ocasionar un crecimiento uniforme en toda la placa, sin lograr la separación de las colonias.

~~Con una pequeña cantidad de muestra, se hacen estrias sobre una cuarta parte aproximadamente, del área de la superficie.~~

Se flamea el asa y se deja enfriar.

Se gira la placa un cuarto de vuelta y se estria de nuevo llevando inóculo de la parte ya estriada originalmente.

Se flamea el asa y se deja enfriar.

Se gira de nuevo la placa y se hacen estrias como se hizo anteriormente en el área restante. Se tapa la placa.

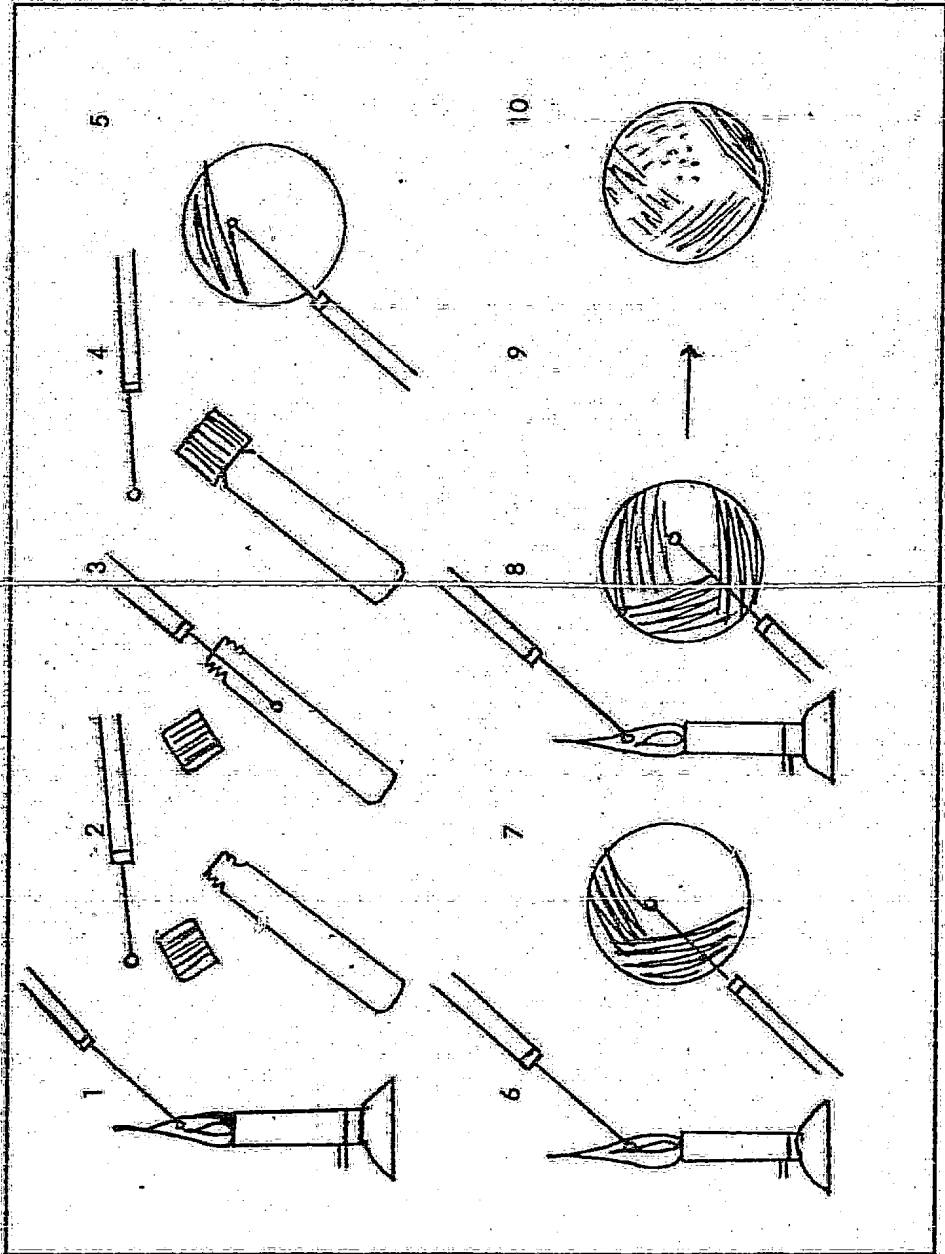
Se flamea el asa para esterilizarla.

Se pone a incubar a la temperatura óptima del microorga
nismo.

Después de la incubación se obtendrán algunas colonias
aisladas, en la última parte estriada.

Los pasos de este método, se muestran en el diagrama si
guiente.

DIAGRAMA No. 1



2.1.2. Diluciones e inoculación por estrías en placas de agar.

Este método se utiliza cuando la muestra posee una flora muy abundante y heterogénea.

Se flamea toda la longitud del asa hasta incandescencia, manteniéndola verticalmente en el mechero Bunsen.

Se deja enfriar.

Se toma una porción de la muestra y se inocula un tubo con 5 ml de solución salina isotónica ó de caldo nutritivo. Se tapa este tubo y se agita. Se flamea el asa y se deja enfriar.

De este tubo se toma una asada y se inocula otro tubo que contiene 5 ml de solución salina isotónica o caldo nutritivo. Se tapa y se agita.

Se flamea el asa y se deja enfriar. De este tercer tubo, se toma una asada y con ella se lleva a cabo la siembra por estrías sobre placa de agar, se toma una segunda asada, se hace una dilución más y se estría, teniendo finalmente dos placas de agar en las cuales se pueda encontrar un aislamiento satisfactorio.

2.1.3. Calentamiento e inoculación por estrías en placas de agar.

Se flamea toda la longitud del asa hasta incandescencia, manteniéndola verticalmente en el mechero Bunsen.

Se deja enfriar. Se toma una asada de la muestra y se inocula a un tubo con 5 ml de solución salina isotónica o de caldo nutritivo. Se tapa este tubo y se agita.

Se calienta este tubo en baño maría a una temperatura elevada, soportada por el microorganismo que se quiere aislar, pero no por aquéllos que se quieren eliminar: (Este tipo de aislamiento se recomienda para microorganismos termorresistentes); durante el máximo tiempo que soporte el microorganismo que nos interesa.

Se esteriliza el asa, se deja enfriar, se toma una asada del tubo que se calentó y se siembra por estrías en una placa de agar.

3.2.2. Identificación

Para realizar la identificación de los microorganismos, se tomaron en cuenta las siguientes características:

- 3.2.2.1. Morfología
- 3.2.2.2. Tinciones.
- 3.2.2.3. Pruebas bioquímicas.

3.2.2.1. Morfología.

La morfología de las bacterias puede considerarse en dos aspectos principales; el de las células aisladas

y el de colonias bacterianas que se desarrollan sobre medios sólidos.

En el caso de células aisladas, las características - morfológicas y dimensiones, proporcionan la base fundamental para su estudio sistemático: éstas son:

- Forma (cocos ó bacilos)
- Dimensiones.
- Presencia de spora
- Posición de la spora
- Forma de los extremos.

Las características que se observaron de las colonias fueron:

- Forma
- Tamaño
- Consistencia.
- Superficie
- Color
- Pigmento
- Opacidad.

3. 2. 2. 1. 1. Tinción de esporas

Para observar la presencia de esporas así como su posición, se llevó a cabo una tinción siguiendo el método de Dörner modificado por Snyder, que se describe a continuación:

Se hace un frotis del cultivo, extendiendo una película delgada, se deja secar y se fija a la flama. Se cubre el frotis con papel filtro y éste se satura con carbolfucsina (de preparación reciente).

Se calienta para que actúe el colorante en forma de vapor sobre una platina calentadora ó un vaso con agua durante 10 minutos, sin dejar que el papel se seque, manteniéndolo en todo momento saturado con el colorante.

Posteriormente se decolora rápidamente con etanol al 95 %.

Se lava con agua de la llave y se cubre con una gota de nigrosina, la cual se extiende uniformemente. Se seca en la estufa sin lavar y se observa al microscopio.

Si el microorganismo al que se le realizó la tinción posee espora, ésta se teñirá de color rojo, - la célula vegetativa se observará incolora y el fondo de color gris.

Ver preparación de los reactivos: Anexo 2.

Como ya se mencionó, por medio de esta tinción se conoce la posición de la espora, que se considera:

Central: cuando se encuentra en el centro del microorganismo.

Terminal: Cuando se encuentra en un extremo del microorganismo

Subterminal: Cuando la espora se encuentra entre el centro y el extremo del microorganismo.

3.2.2.2. Tinción de Gram.

Se hace un frotis sobre un portaobjetos, fijándose por calentamiento. Posteriormente se aplica sobre el frotis el cristal violeta durante un minuto, se lava con agua y se aplica seguidamente una solución yodurada diluida de lugol durante un minuto, se lava con agua.

Se trata después con una solución de alcohol-acetona durante 10 a 30 segundos; y se lava con agua. Se aplica la safranina por 30 segundos; se lava con agua y se deja secar.

Ver preparación de los reactivos: Anexo 2

3.2.2.3. Pruebas Bioquímicas.

Pruebas de Hidrólisis.

Hidrólisis del almidón.

Esta prueba se realiza inoculando una placa de agar almidón por estriás separadas, cruzando solo una vez la superficie y se incuba a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo por un período de 2 a 14 días.

Una vez transcurrido este período, se destapa la caja y se vierten en ella de 5 a 10 ml de reactivo, (solución yodurada).

Un halo transparente alrededor de la colonia indica la hidrólisis del almidón, como resultado de la actividad de la beta -amilasa.

Una zona café rojiza alrededor de la colonia indica una hidrólisis parcial del almidón (a dextrinas), como resultado de la actividad de la alfa-amilasa.

Hidrólisis de Arginina con producción de amoníaco.

Esta prueba se realiza inoculando un tubo con medio de arginina e incubándolo a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo junto con un tubo control por 5 días.

La interpretación de esta prueba se realiza añadiendo a 1 ml de cultivo, 1 ml del reactivo de Nessler. El desarro--

llo de un color naranja a café indica la presencia de amoníaco, como resultado de la hidrólisis de la arginina; el tubo control estéril se debe verificar al mismo tiempo, mostrando un color amarillo pálido o sin reacción colorida.

Hidrólisis de la gelatina.

Se siembra un inóculo abundante en un tubo con medio de gelatina y se agita.

Se incuba 5 días a la temperatura óptima del microorganismo, antes de reportarla como negativa. Cada día se debe sacar el tubo de la incubadora y refrigerar un mínimo de 30 minutos.

Esta prueba será positiva si después de refrigerar hay licuefacción de la gelatina. Será negativa si después de refrigerar se forma el gel.

Hidrólisis del Hipurato de sodio.

Se siembra el microorganismo en un tubo con caldo de hipurato, se incuba durante 72 horas y posteriormente se toman 0.8 ml de este caldo que se colocan en un tubo pequeño, donde se agregan 0.2 ml del reactivo de cloruro férrico, después de 10 minutos se observan los resultados.

Un precipitado permanente indica la presencia del ácido

benzoico, (hidrólisis positiva). La ausencia de precipitado indica que la prueba es negativa.

Hidrólisis de la urea.

Se inocula el microorganismo en un tubo con medio de urea y se incuba a 37°C. Se observan los tubos después de 8, 12, 24 y 48 horas y todos los días durante una semana.

El desarrollo de un color rosa a rojo violáceo indica hidrólisis de la urea, es decir, prueba positiva. Dependiendo de la extensión del color a través del medio, será el grado de la hidrólisis efectuada. Si el medio permanece de color amarillo pálido, la prueba es negativa.

OTRAS PRUEBAS

Prueba de la Catalasa.

Esta prueba se puede realizar de dos maneras:

a) Se agrega 1 ml de peróxido de hidrógeno sobre la superficie del cultivo en agar. Alternativamente, una parte del crecimiento puede ser probado con 1 o 2 gotas de peróxido de hidrógeno sobre un portaobjetos.

b) Se agrega 1 ml de peróxido de hidrógeno en un tubo limpio y después se añade 1 ml del cultivo retirado asépticamente del caldo de cultivo.

Esta prueba no debe realizarse con cultivos obtenidos en gelasa sangre.

Una efervescencia causada por el desprendimiento de oxígeno libre, como burbujas de gas, indica la presencia de catalasa en el cultivo probado. Si no hay efervescencia la prueba es negativa.

Desaminación de la fenilalanina.

Se inocula el microorganismo en un tubo inclinado con medio de fenilalanina y se incuba durante 24 horas a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo.

Se añaden 4 ó 5 gotas del reactivo prueba de cloruro férrico, dejando que corran a lo largo del crecimiento.

El desarrollo de un color verde en la superficie del medio y el fluido indica la desaminación de la fenilalanina.

Fermentación de carbohidratos.

Dependiendo del microorganismo se usan diferentes medios base a los cuales se les adiciona el carbohidrato estudiado.

Se inocula el medio y se incuba a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo. Estos tubos se deben observar cada 24 horas durante una semana, para ver si hay cambio de color del indicador del medio.

Un cambio en el color del indicador del medio, revela la producción de ácido como consecuencia de la fermentación del carbohidrato estudiado. Si no hay cambio en el color -- del indicador del medio, comparado con el testigo, la prueba es negativa.

Reacciones en leche tornasol.

Se inoculan los tubos con leche tornasol y se incuban a 37°C por 24 horas.

La aparición de un color rosado indica una reacción ácida y la fermentación de la lactosa.

El desarrollo de un color azul-púrpura indica que no hubo fermentación de la lactosa, ni variación en el indicador de pH.

Si el color desarrollado es azul, indica una reacción alcalina, debida a que no se fermentó la lactosa y que los microorganismos actuaron sobre las sustancias nitrogenadas presentes en el medio.

Un color blanco indica la reducción del tornasol a su leuco base, ya que el tornasol actúa como aceptor de electrones.

La formación de grumos indica la coagulación de las proteínas de la leche por la producción de ácido a partir de lactosa.

La coagulación también puede ser causada por la conversión de la caseína a paracaseína por la enzima renina.

Si el medio presenta un color blanco claro, indica peptonización o sea digestión de la caseína por enzimas proteolíticas.

Reducción de Acetoina.

Modificación de Barrit: se inocular el caldo de glucosa fosfato y se incuba a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo estudiado, por un lapso de 2 a 7 días.

A 1 ml de cultivo en un tubo-prueba, se le adiciona 0.5 ml de la solución de alfa-naftol y 0.5 ml de la solución de hidróxido de potasio. Se agita el tubo.

El desarrollo de una coloración roja dentro de los 5 minutos siguientes a la adición de los reactivos, indica una reacción positiva. Si no varía el color amarillo pálido del medio cuando se le adicionan los reactivos, la prueba es negativa.

Prueba de oxidación-fermentación.

Para esta prueba se utiliza el medio basal de oxidación-fermentación al cual se le añade el carbohidrato.

Para cada carbohidrato usado se inocula un par de tubos uno de ellos se sella con 1 a 2 ml de aceite mineral estéril. Estos tubos se corren junto con dos controles:

- inoculado sin carbohidrato
- no inoculado con carbohidrato

Se incuban los tubos a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo.

El resultado se lee después de 3 ó 4 días.

Interpretación:

En este medio además de detectar la utilización del carbohidrato, se detectan la producción de gas y la movilidad.

Para leer los resultados se toma como referencia el siguiente cuadro:

	Tubo con carbohidrato, inoculado	Tubo con carbohidrato sellado, inoculado	Tubo sin carbohidrato sellado, inoculado	Tubo con carbohidrato, no inoculado
OXIDACION	amarillo	verde	testigo (verde)	testigo (verde)
FERMENTACION	amarillo	amarillo	testigo (verde)	testigo (verde)

Reducción de Nitratos.

Se inocula el agua peptonada y se incuba junto con un tubo control estéril a la temperatura óptima de crecimiento durante 2 a 7 días.

Para observar los resultados se añaden 1 ml de cada reactivo (reactivo 1 y 2) al cultivo y al tubo control.

La presencia de nitritos se indica por la aparición de un color rojo después de 5 a 10 minutos. El control puede mostrar una coloración rosada o nula.

Un resultado negativo puede ser confirmado por la adición de una pequeña cantidad de polvo de zinc al tubo. El desarrollo de un color rojo indica la presencia de nitratos y por lo tanto que no se ha realizado la reducción.

La presencia de gas en el tubo de Durham, indica la formación de nitrógeno gaseoso y además la reducción completa de los nitratos.

Sulfhídrico, Indol, Movilidad (SIM).

Se inocula el medio de SIM por punción en el centro, hasta la mitad de su profundidad. Se incuba a la temperatura óptima del microorganismo por un período de 24 a 48 horas.

La aparición de un color negro en el medio indica la -- formación de ácido sulfhídrico que se ha formado por acción enzimática sobre aminoácidos que contienen azufre.

La movilidad se aprecia si el crecimiento se encuentra difundido en el medio. Un crecimiento sólo en la picadura, indica que el microorganismo es inmóvil.

Para saber si hubo producción de indol a partir de trip tofano, se añade 1.0 ml del reactivo de Ehrlich al tubo, se agita suavemente el tubo, se deja reposar 5 minutos, la aparición de un color rojo-violeta, indica que sí hubo producción de indol.

NOTA.-

Para consultar la preparación de los medios de cultivo y los reactivos, ver anexos.

Pruebas biológicas para la identificación de:

Listeria monocytogenes.

1. Prueba de Anton.

Procedimientos:

Instalar una gota de un cultivo de 24 horas, en el saco conjuntival de un conejo o un cuyo joven. Observar al animal diariamente durante cinco días.

Interpretación:

Una conjuntivitis purulenta desarrollada en un lapso de 24 a 36 horas seguida de una queratitis indica que se trata de Listeria monocytogenes. El saco conjuntival del ojo no inoculado sirve como testigo.

2. Producción de monocitos.**Procedimiento:**

Inocular la vena marginal de la oreja de un conejo con 0.5 ml de una suspensión de cultivo estandarizado con agua destilada al tubo núm. 1 del nefelómetro de Mc. Farland, -- (3×10^8 microorg/ml).

Interpretación:

Se observa un marcado aumento de monocitos (el aumento debe ser mayor del 40%, si no es así, no se toma en cuenta.) después de 5 días, si el cultivo es de Listeria monocytogenes.

NOTA:

Estas pruebas no se realizaron porque Listeria monocytogenes es transmitida al hombre a través de animales domésticos y porque, las condiciones del bioterio de la Facultad de Química no son adecuadas para este tipo de pruebas.

3.2.3. Conservación

Método para la liofilización.

Una vez identificado el microorganismo, se verifica su pureza mediante tinción de Gram y se procede a propagarlo, sembrando en tubos con el medio de conservación para cada cepa e incubando a 37°C durante 24 horas. Se verifica la pureza de la cepa mediante tinción de Gram y se cosecha añadiendo a cada tubo de cultivo 3 ml de leche bacteriológica estéril. Se suspende en ella el desarrollo obtenido. Se llenan las ampolletas (etiquetadas y esterilizadas) mediante pipetas Pasteur y se toman alícuotas de esta suspensión para efectuar la prueba de viabilidad, realizando diluciones en solución salina hasta 10⁻¹². Se siembran las diluciones en placas con su medio de conservación y se incuban a 37°C durante 24 horas.

A continuación, las ampolletas etiquetadas y llenas se colocan en una mezcla de hielo seco y etanol para lograr una congelación en esta mezcla. Al otro día se meten en frascos de centrifuga y se colocan en la liofilizadora. Una vez liofilizadas, se colocan en un desecador para evitar que se hidraten mientras se sellan.

Para cerrarlas se sellan al vacío con soplete de gasoxígeno. Se verifica el sellado, sumergiendo las ampolletas en solución de fenol al 5% con púrpura de bromocresol -

en un matraz Kitasato; se tapa el matraz y se hace vacío durante unos minutos, rompiendo el vacío bruscamente de modo que la solución colorida penetre por cualquier fisura de las ampollitas mal selladas.

Se verifica el vacío dentro de las ampollitas mediante un generador de alta frecuencia, chequeando si se transmite la luz ultravioleta que éste produce, al interior de la ampollita.

Las ampollitas aceptadas se ordenan debidamente y se refrigeran.

Como pruebas de control posteriores a la liofilización, se realizaron la prueba de pureza y la prueba de viabilidad.

No se realizaron nuevamente las pruebas bioquímicas por la escasez y el alto costo de los medios y reactivos que se requieren y porque nunca se ha reportado, ni se han detectado en el Cepario, variaciones en las características bioquímicas después de la liofilización.

METODO PARA REHIDRATAR LAS CEPAS LIOFILIZADAS

Se marca el perímetro a la ampollita con una sierra metálica, a la altura donde termina la etiqueta.

Se deja la ampollita en solución de fenol al 5% durante 30 minutos por lo menos, para eliminar microorganismos contaminantes de la superficie de la ampollita.

Se ponen también en el fenol unas pinzas de disección - para tomar la ampollita.

Se saca la ampollita del fenol con las pinzas y se coloca entre una compresa de gasa estéril, cuidando de no tocar la compresa por la parte que estará en contacto con la ampollita.

Haciendo presión con los dedos, se rompe la ampollita - por la parte marcada con sierra.

Con una pipeta Pasteur estéril o una jeringa estéril, - se agrega a la ampollita un volumen de 0.3 ml de infusión cerebro-corazón probado de esterilidad.

Se agita con la pipeta o con la aguja de la jeringa y - se transfiere a un tubo con el mismo medio de cultivo, probado de esterilidad.

Se repite esta operación 3 ó 4 veces, hasta haber retirado de la ampollita todo resto del liofilizado.

Se incuba el medio inoculado con el liofilizado, durante 24 a 48 horas, a la temperatura óptima de desarrollo del

microorganismo (o hasta que hubiere desarrollo abundante)

Se esterilizan en autoclave los restos de la ampolleta y de la compresa y se desinfecta la jeringa o pipeta en fenol al 5% antes de lavarlas.

CAPITULO 4

R E S U L T A D O S

RESULTADOS

Las ampolletas, que son el producto ó resultado más importante, se conservan en el Cepario de la Facultad de Química de la UNAM.

Los resultados obtenidos en cuanto a características -- morfológicas y bioquímicas, se encuentran en los cuadros siguientes, que son los mismos con los que cada cepa queda registrada en el Cepario de esta Facultad.

Junto con el cuadro de registro de características morfológicas y bioquímicas, se llena otro cuadro con las características generales y otro con los datos de liofilización y viabilidad antes y después del proceso. Por lo tanto, cada cepa queda registrada con un juego de cuadros como el siguiente:

No. DE CEPA _____ NOMBRE *Bacillus subtilis* ATCC 6051 Cuadro: 2

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS
 Medio Base: *Caldo púrpura de bromocresol* Ed.
 pag. 532

ANTES DESPUES		ANTES DESPUES		ANTES DESPUES	
FORMA <i>Bacilar</i>		ADONITOL		ACIDO SULFHIDRICO	-
TAMARO		ALMIDON	+	INDOL	-
AGRUPACION <i>Aislados y en cadenas</i>		ARABINOSA	+	CATALASA	+
TINCION DE GRAM	+	DEXTRINA		COAGULASA	
ACIDO-ALCOHOL RES.		DULCITOL		OXIDASA	
CAPSULA		ERITRITOL		CRECIMIENTO EN KCN	
ESPORAS <i>Central</i>		FRUCTOSA		CITRATO	+
OTRAS		GALACTOSA		SALES DE AMONIO	
		GLICEROL		HIDROLISIS ALMIDON	+d
MOVILIDAD	+	GLUCOGENO		HIDROLISIS ESCULINA	
		GLUCOSA	+	HIDROLISIS HIPURATO	-
		INOSITOL		HIDROLISIS GELATINA	+
CARACTERISTICAS DE CULTIVO		INULINA		HIDROLISIS UREA	
MEDIO		LACTOSA		REDUCCION DE NITRATOS	+
TIEMPO <i>24 hrs.</i>		MALTOSA		VOGES-PROSKAUER	+
TEMPERATURA <i>37°C</i>		MANITOL	+	RO. ID. DE METILO	
COLONIAS <i>Elevadas, convexas.</i>		MANOSA		LECHE TORNASOL	
FORMA <i>Circular</i>		RAFINOSA		SUERO	
TAMARO <i>2 a 3 mm de diámetro</i>		RAMNOSA		GELOSA-SANGRE	
SUPERFICIE <i>lisa</i>		RIBOSA			
COLOR <i>Crema</i>		SACAROSA		OTRAS:	
PIGMENTO		SALICINA		<i>Crecimiento en agar anaeróbico -</i>	
CONSISTENCIA <i>Mucolde</i>		SORBITOL		<i>Crecimiento en 5% de NaCl +</i>	
OPACIDAD <i>Opacas</i>		SORBOSA		<i>Crecimiento en 7% de NaCl +</i>	
OTRAS		TREHALOSA		<i>Crecimiento en Caldo dextrosa</i>	
		XILOSA	+d	<i>Sabouraud +</i>	
		OTROS:			
		<i>Glucosa (gas) -</i>			
		<i>Arabinosa (gas) -</i>			
		<i>Xylose (gas) -</i>			
		<i>Manitol (gas) -</i>			
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS					
NOMBRE					
SUSTRATO					
CONDICIONES					
RENDIMIENTO					
OTROS DATOS				SEROLOGICAS	



No. DE CEPA: _____ NOMBRE: *Bacillus subtilis* var. *niger* Cfr. dno: ?

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS
 MEDIO BASE: Caldo púrpura de bro-
 macresol, Bergey's 84, 81.

ANTES DESPUES		DES. 532	ANTES DESPUES	ANTES DESPUES
FORMA <i>Bacilar</i>		ADONITOL		ACIDO SULFHDRIICO
TAMARO		ALMIDON		INDOL
AGRUPACION <i>Soios y en cadenas cor-</i>		ARABINOSA	+d	CATALASA
TINGION DE GRAM <i>+</i>	<i>tas</i>	DEXTRINA		COAGULASA
ACIDO-ALCOHOL RES.		DULCITOL		OXIDASA
CAPSULA		ERITRITOL		CRECIMIENTO EN KCN
ESPORAS <i>Central</i>		FRUCTOSA		CITRATO
OTRAS		GALACTOSA		SALES DE AMONIO
		GLICEROL		HIDROLISIS ALMIDON
		GLUCOGENO		HIDROLISIS ESCULINA
MOVILIDAD <i>- +</i>		GLUCOSA	+	HIDROLISIS HIPURATO
		INOSITOL		HIDROLISIS GELATINA
		INULINA		HIDROLISIS UREA
CARACTERISTICAS DE CULTIVO		LACTOSA		REDUCCION DE NITRATOS
MEDIO:		MALTOSA		VOGES-PROSKAUER
TIEMPO <i>24 hrs.</i>		MANITOL	+d	ROJO DE METILO
TEMPERATURA <i>37°C</i>		HANOSA		LECHE TORNASOL
COLONIAS		RAFINOSA		SUERO
FORMA <i>Circular</i>		RAMNOSA		GELOSA-SANGRE
TAMARO <i>2 a 3 mm de diametro</i>		RIBOSA		OTRAS:
SUPERFICIE <i>lisa</i>		SACAROSA		
COLOR <i>parencia</i>		SALICINA		
PIGMENTO		SORBITOL		
CONSISTENCIA <i>mucoide</i>		SORBOSA		
OPACIDAD <i>lustrosa</i>		TREHALOSA		
OTRAS		XILOSA		
		OTROS:		
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS				
NOMBRE				
SUSTRATO				
CONDICIONES				
RENDIMIENTO				
OTROS DATOS				SEROLOGICAS

126



No. DE CEPA

NOMBRE Bacillus pumilus

Código: 4

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS		MEDIO BASE: <u>Caldo púrpura de bro-</u> <u>mocresol. Bergeys 8a.</u>		Ed.			
ANTES		DESPUES		ANTES		DESPUES	
FORMA <u>Bacilar</u>		ADONITOL		ACIDO SULFHIDRICO =			
TAMANO		ALMIDON		INDOL =			
AGRUPACION <u>Aislados y en cadenas</u>		AKABINOSA +d		CATALASA +			
TINCION DE GRAM +		DEXTRINA		COAGULASA			
ACIDO-ALCOHOL RES.		DULCITOL		OXIDASA			
CAPSULA		ERITRITOL		CRECIMIENTO EN KCN			
ESPORAS <u>Central</u>		FRUCTOSA		CITRATO +			
OTRAS		GALACTOSA		SALES DE AMONIO			
MOVILIDAD +d		GLICEROL		HIDROLISIS ALMIDON -			
CÁRACTERISTICAS DE CULTIVO		GLUCOGENO		HIDROLISIS ESCULINA			
MEDIO:		GLUCOSA +		HIDROLISIS HIPURATO +			
TIEMPO <u>24 hrs.</u>		INOSITOL		HIDROLISIS GELATINA			
TEMPERATURA <u>37°C</u>		INULINA		HIDROLISIS UREA			
COLONIAS <u>Elevadas</u>		LACTOSA		REDUCCION DE NITRATOS			
FORMA <u>Circular</u>		MALTOSA		VOGES-PROSKAUER +			
TAMANO <u>1 a 2 mm de diámetro</u>		MANITOL +d		ROJO DE METILO			
SUPERFICIE <u>Lisa</u>		MANOSA		LECHE TORNASOL			
COLOR <u>Amarillo pálido</u>		RAFINOSA		SUERO			
PIGMENTO		RAMNOSA		GELOSA-SANGRE			
CONSISTENCIA <u>Mucóide</u>		RIBOSA		OTRAS:			
OPACIDAD <u>Opacas</u>		SACAROSA		Crecimiento en agar anaeróbico -			
OTRAS		SALICINA		Crecimiento en 5% de NaCl +			
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS		SORBITOL		Crecimiento en 7% de NaCl +			
NOMBRE		SORBOSA		Crecimiento en Caldo dextrosa			
SUSTRATO		TREHALOSA		saboraud +			
CONDICIONES		XILOSA +d		Hidrólisis de caseína +			
RENDIMIENTO		OTROS:					
OTROS DATOS		Glucosa (gas) -		SEROLOGICAS			
		Xylosa (gas) -					
		Arabinosa (gas) -					
		Manitol (gas) -					

127



No. DE CEPA

NOMBRE *Bacillus licheniformis* ATCC 9980

Cuadro: 7

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS
Galdó de púrpura de bro-
MEDIO BASE: mocresol, Bergeys 8a. Ed.

ANTES DESPUES		pag. 532	ANTES DESPUES	ANTES DESPUES
FORMA <u>Bacilar</u>		ADONITOL		ACIDO SULFHIDRICO -
TAMANO		ALMIDON		INDOL -
AGRUPACION <u>Aislados y en cadenas</u>		ARABINOSA +		CATALASA +
TINCION DE GRAM +	<u>correa</u>	DEXTRINA		COAGULASA
ACIDO-ALCOHOL RES.		DULCITOL		OXIDASA
CAPSULA		ERITRITOL		CRECIMIENTO EN KCN
ESPORAS <u>Central</u>		FRUCTOSA		CITRATO +
OTRAS		GALACTOSA		SALES DE AMONIO
		GLICEROL		HIDROLISIS ALMIDON +
		GLUCOGENO		HIDROLISIS ESCULINA
MOVILIDAD +		GLUCOSA +		HIDROLISIS HIPURATO -
		INOSITOL		HIDROLISIS GELATINA +
CARACTERISTICAS DE CULTIVO		INULINA		HIDROLISIS UREA
MEDIO:		LACTOSA		REDUCCION DE NITRATOS +
TIEMPO <u>24 hrs.</u>		MALTOSA		VOGES-PROSKAUER +
TEMPERATURA <u>37°C</u>		MANITOL +		ROJO DE METILO
COLONIAS <u>Elevadas, convexas.</u>		MANOSA		LECHE TORNASOL
FORMA <u>Irregular</u>		RAFINOSA		SUERO
TAMANO <u>3-4 mm</u>		RAMNOSA		GELOSA-SANGRE
SUPERFICIE <u>Rugosa</u>		RIBOSA		OTRAS:
COLOR <u>Blanco amarillento</u>		SACAROSA		<u>Crecimiento en agar anaeróbico +</u>
PIGMENTO		SALICINA		<u>Crecimiento en 5% de NaCl +</u>
CONSISTENCIA <u>Viscosa</u>		SORBITOL		<u>Crecimiento en 7% de NaCl +d</u>
OPACIDAD <u>Opacas</u>		SORBOSA		<u>Crecimiento en caldo de dextrosa</u>
OTRAS		TREHALOSA		<u>sabouraud +</u>
		XILOSA +		<u>Hidrólisis de caseína +</u>
		OTROS:		<u>Arginina dihidrolasa +</u>
		Glucosa (gas) -		
		Arabinosa (gas) -		
		Xylose (gas) -		
		Manitol (gas) -		
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS				
NOMBRE				
SUSTRATO				
CONDICIONES				
RENDIMIENTO				
OTROS DATOS				SEROLOGICAS



No. DE CEPA: _____ NOMBRE: Bacillus circulans ATCC 9966 Fecha: 16

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS
 MEDIO BASE: Caldo púrpura de bro-
mocresol. Bergeys 8^a Ed.

ANTES DESPUES		pag. 532	ANTES DESPUES		ANTES DESPUES	
FORMA <u>Bacilar</u>		ADONITOL		ACIDO SULFIDRICO	-	
TAMANO		ALMIDON		INDOL	-	
AGRUPACION <u>Aislados y en cadenas cortas</u>		ARABINOSA	+d	CATALASA	+	
TINCION DE GRAM <u>+</u>		DEXTRINA		COAGULASA		
ACIDO-ALCOHOL RES.		DULCITOL		OXIDASA		
CAPSULA		ERITRITOL		CRECIMIENTO EN KCN		
ESPORAS <u>Subterminal</u>		FRUCTOSA		CITRATO	+	
OTRAS		GALACTOSA		SALES DE AMONIO		
		GLICEROL		HIDROLISIS ALMIDON	+	
MOVILIDAD <u>+</u>		GLUCOGENO		HIDROLISIS ESCULINA		
		GLUCOSA	+	HIDROLISIS HIPURATO		
		INOSITOL		HIDROLISIS GELATINA		
		INULINA		HIDROLISIS UREA		
CARACTERISTICAS DE CULTIVO		LACTOSA		REDUCCION DE NITRATOS		
MEDIO:		MALTOSA		VOGES-PROSKAUER	+	
TIEMPO <u>24 hrs.</u>		MANITOL	+	ROJO DE METILO		
TEMPERATURA <u>37°C</u>		MANOSA		LECHE TORNASOL		
COLONIAS <u>Puntiformes</u>		RAFINOSA		SUERO		
FORMA <u>Circular</u>		RAMNOSA		GELOSA-SANGRE		
TAMANO <u>1 mm de diametro aprox.</u>		RIBOSA				
SUPERFICIE <u>lisa</u>		SACAROSA		OTRAS:		
COLOR <u>Blanco</u>		SALICINA		<u>Crecimiento en agar anaeróbico +</u>		
PIGMENTO		SORBITOL		<u>Crecimiento en 5% de NaCl +</u>		
CONSISTENCIA <u>Viscosa</u>		SORBOSA		<u>Crecimiento en 7% de NaCl +d</u>		
OPACIDAD <u>Translúcidas</u>		TREHALOSA		<u>Crecimiento en Caldo dextrosa</u>		
OTRAS		XILOSA	-	<u>sebouraud +d</u>		
		OTROS:		<u>Hidrólisis de caseína +</u>		
		<u>Glucosa (gas) -</u>		<u>Desaminación de la fenilalanina</u>		
		<u>Xyloza (gas) -</u>				
		<u>Manitol (gas) -</u>				
		<u>Ara. inos. (gas) -</u>				
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS						
NOMBRE						
SUSTRATO						
CONDICIONES						
RENDIMIENTO						
OTROS DATOS				SEROLOGICAS		

No. DE CEPAS.		NOMBRE <u>Bacillus coagulans</u>		Fecha: 18	
		UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS Caldo púrpura de bro-		Ed.	
		MEDIO BASE: mocresol. Bergeys 8a.			
		pag. 532			
ANTES DESPUES		ANTES DESPUES		ANTES DESPUES	
FORMA <u>Bacilar</u>		ADONITOL		ACIDO SULFHDRIICO	-
TAMANO		ALMIDON		INDOL	-
AGRUPACION <u>Aislados y en cadenas</u>		ARABINOSA	-	CATALASA	+
TINCION DE GRAM <u>+</u>	<u>corta</u>	DEXTRINA		COAGULASA	
ACIDO-ALCOHOL RES.		DULCITOL		OXIDASA	
CAPSULA		ERITRITOL		CRECIMIENTO EN KCN	
ESPORAS <u>Subterminal</u>		FRUCTOSA		CITRATO	-
OTRAS		GALACTOSA		SALES DE AMONIO	
		GLICEROL		HIDROLISIS ALMIDON	+d
MOVILIDAD <u>+</u>		GLUCOGENO		HIDROLISIS ESCULINA	
		GLUCOSA	+	HIDROLISIS HIPURATO	
		INOSITOL		HIDROLISIS GELATINA	-
		INULINA		HIDROLISIS UREA	
		LACTOSA		REDUCCION DE NITRATOS	+
		MALTOSA		VOGES-PROSKAUER	+d
		MANITOL	-	ROJO DE METILO	
		MANOSA		LECHE TORNASOL	
		RAFINOSA		SUERO	
		RAMNOSA		GELOSA-SANGRE	
		RIBOSA			
		SACAROSA		OTRAS:	
		SALICINA		<u>CreCIMIENTO en agar anaeróbico +</u>	
		SORBITOL		<u>CreCIMIENTO en 5% de NaCl -</u>	
		SORBOSA		<u>CreCIMIENTO en 7% de NaCl -</u>	
		TREHALOSA		<u>CreCIMIENTO en Caldo dextrosa</u>	
		XILOSA	-	<u>sabouraud +</u>	
		OTROS:		<u>Hidrólisis de caseína +</u>	
		<u>Glucosa (gas) -</u>		<u>Desaminación de la fenilalanina</u>	
		<u>Arabinosa (g-s) -</u>			
		<u>Xilosa (gas) -</u>			
		<u>Manitol (gas) -</u>			
CARACTERISTICAS DE CULTIVO					
MEDIO:					
TIEMPO <u>24 hrs</u>					
TEMPERATURA <u>37°C</u>					
COLONIAS <u>Elevadas, convexas</u>					
FORMA <u>Circular</u>					
TAMANO <u>1 mm de diámetro aprox</u>					
SUPERFICIE <u>Lisa</u>					
COLOR <u>Blanco</u>					
PIGMENTO					
CONSISTENCIA <u>Viscosa</u>					
OPACIDAD <u>Translúcidas.</u>					
OTRAS					
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS					
NOMBRE					
SUSTRATO					
CONDICIONES					
RENDIMIENTO					
OTROS DATOS					
				SEROLOGICAS	



No. DE CEPA		NOMBRE <u>Clostridium novyi</u>		Cebro: 22	
		UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS			
		MEDIO BASE: Base de agar tripticasefina.			
ANTES DESPUES		ANTES DESPUES		ANTES DESPUES	
FORMA <u>Bacilar</u>		ADONITOL		ACIDO SULFHDIRICO	-
TAMARO		ALMIDON		INDOL	
AGRUPACION <u>aislados y en cadenas cortas</u>		ARABINOSA		CATALASA	
TINCION DE GRAM <u>+</u>		DEXTRINA		COAGULASA	
ACIDO-ALCOHOL RES.		DULCITOL		OXIDASA	
CAPSULA		ERITRITOL		CRECIMIENTO EN KCN	
ESPORAS <u>Subterminal</u>		FRUCTOSA		CITRATO	
OTRAS		GALACTOSA		SALES DE AMONIO	
		GLICEROL		HIDROLISIS ALMIDON	
MOVILIDAD <u>+</u>		GLUCOGENO		HIDROLISIS ESCULINA	
		GLUCOSA	+	HIDROLISIS HIPURATO	
		INOSITOL	+	HIDROLISIS GELATINA	+
		INULINA		HIDROLISIS UREA	
		LACTOSA		REDUCCION DE NITRATOS	+
		MALTOSA	+	VOGES-PROSKAUER	-
		MANITOL	-	ROJO DE METILO	
		MANOSA		LECHE TORNASOL	
		RAFINOSA		SUERO	
		RAMNOSA		GELOSA-SANGRE	
		RIBOSA			
		SACAROSA	-		
		SALICINA	-	OTRAS:	
		SORBITOL			
		SORBOSA			
		TREHALOSA			
		XILOSA			
		OTROS:			
CARACTERISTICAS DE CULTIVO					
MEDIO:					
TIEMPO <u>72 hrs.</u>					
TEMPERATURA <u>37°0</u>					
COLONIAS <u>Convexas</u>					
FORMA <u>Circular</u>					
TAMARO <u>1 a 3 mm de diametro</u>					
SUPERFICIE <u>lisa</u>					
COLOR <u>Blanco translucido</u>					
PIGMENTO					
CONSISTENCIA <u>Mucoides</u>					
OPACIDAD <u>Lustros:s</u>					
OTRAS					
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS					
NOMBRE					
SUSTRATO					
CONDICIONES					
RENDIMIENTO					
OTROS DATOS				SEROLOGICAS	

145



No. DE CEPA _____ NOMBRE Lactobacillus leichmannii Suave 128

UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS
MEDIO BASE: CTA

ANTES DESPUES		ANTES DESPUES		ANTES DESPUES	
FORMA <u>Bacilar</u>		ADONITOL		ACIDO SULFHDRIDICO	-
TAMANO		ALMIDON		INDOL	-
AGRUPACION <u>Aislados y cadenas cortas.</u>		ARABINOSA		CATALASA	-
TINCION DE GRAM <u>+</u>		DEXTRINA		COAGULASA	
ACIDO-ALCOHOL RES.		DULCITOL		OXIDASA	
CAPSULA		ERITRITOL		CRECIMIENTO EN KCN	
ESPORAS		FRUCTOSA		CITRATO	
OTRAS		GALACTOSA		SALES DE AMONIO	
		GLICEROL		HIDROLISIS ALMIDON	
		GLUCOGENO		HIDROLISIS ESCULINA	
MOVILIDAD <u>-</u>		GLUCOSA <u>+d</u>		HIDROLISIS HIPURATO	
		INOSITOL		HIDROLISIS GELATINA	-
		INULINA		HIDROLISIS UREA	
		LACTOSA <u>+</u>		REDUCCION DE NITRATOS	-
		MALTOSA		VOGES-PROSKAUER	
		MANITOL <u>-</u>		ROJO DE METILO	
		MANOSA <u>+</u>		LECHE TORNASOL	
		RAFINOSA		SUERO	
		RAMNOSA		GELOSA-SANGRE	
		RIBOSA <u>-</u>			
		SACAROSA <u>+d</u>		OTRAS:	
		SALICINA		<u>Metabolismo</u> *	<u>fer</u>
		SORBITOL		<u>Arginina dihidrolasa</u>	<u>+</u>
		SORBOSA			
		TREHALOSA			
		XILOSA			
		OTROS:			
		<u>Amigdalina</u> <u>+d</u>			
		<u>Celobiosa</u> <u>+</u>			

CARACTERISTICAS DE CULTIVO

MEDIO:

TIEMPO 24 hrs.

TEMPERATURA 42°C

COLONIAS Elevadas

FORMA Circular

TAMANO 1 a 2 mm de diametro

SUPERFICIE Rugosa

COLOR Blanco

PIGMENTO

CONSISTENCIA Mucoide

OPACIDAD Opacas

OTRAS

PRODUCTOS DE BIOSINTESIS

NOMBRE

SUSTRATO

CONDICIONES

RENDIMIENTO

OTROS DATOS

SEROLOGICAS

* Prueba de oxidación fermentación.



No. DE CEPA		NOMBRE <u>Lactobacillus casei</u>		Cualro : 30	
		UTILIZACION DE CARBOHIDRATOS			
		MEDIO BASE: <u>CTA</u>			
ANTES DESPUES		ANTES DESPUES		ANTES DESPUES	
FORMA <u>Bacilar</u>		ADONITOL		ACIDO SULFHDIRICO	-
TAMANO		ALMIDON		INDOL	-
AGRUPACION <u>Aislados y en cadenas cortas.</u>		ARABINOSA		CATALASA	-
TINCION DE GRAM <u>+</u>		DEXTRINA		COAGULASA	
ACIDO-ALCOHOL RES.		DULCITOL		OXIDASA	
CAPSULA		ERITRITOL		CRECIMIENTO EN KCN	
ESPORAS		FRUCTOSA <u>+</u>		CITRATO	
OTRAS		GALACTOSA <u>+</u>		SALES DE AMONIO	
		GLICEROL		HIDROLISIS ALMIDON	
		GLUCOGENO		HIDROLISIS ESCULINA	
MOVILIDAD <u>-</u>		GLUCOSA		HIDROLISIS HIPURATO	
		INOSITOL		HIDROLISIS GELATINA	
		INULINA		HIDROLISIS UREA	
CARACTERISTICAS DE CULTIVO		LACTOSA <u>+d</u>		REDUCCION DE NITRATOS	-
MEDIO:		MALTOSA		Voges-Proskauer	
TIEMPO <u>24 hrs.</u>		MANITOL <u>+d</u>		ROJO DE METILO	
TEMPERATURA <u>47°C</u>		MANOSA <u>+</u>		LECHE TORNASOL	
COLONIAS <u>Poco elevadas</u>		RAFINOSA		SUERO	
FORMA <u>Oval</u>		RAMNOSA		GELOSA-SANGRE	
TAMANO <u>1 a 2 mm</u>		RIBOSA			
SUPERFICIE <u>Lisa</u>		SACAROSA <u>+</u>		OTRAS:	
COLOR <u>Amarillo pálido</u>		SALICINA		Metabolismo * <u>fer</u>	
PIGMENTO		SORBITOL <u>+d</u>		Arginina dihidrolasa	-
CONSISTENCIA <u>Viscosa</u>		SORBOSA			
OPACIDAD <u>Lustrosas</u>		TREHALOSA			
OTRAS		XILOSA			
		OTROS:			
		Melezitosa <u>+</u>			
		Celobiosa <u>+</u>			
		Esculina <u>-</u>			
PRODUCTOS DE BIOSINTESIS					
NOMBRE					
SUSTRATO					
CONDICIONES					
RENDIMIENTO					
OTROS DATOS				SEROLOGICAS	

* Prueba de oxidación fermentación.

CAPITULO 5
DISCUSION DE RESULTADOS

Los microorganismos de esta subcolección presentaron diferencias en sus características bioquímicas con respecto a la literatura.

A continuación se presenta una lista de los microorganismos, indicando el número de cuadro de resultados que le corresponde a cada uno:

	Cuadro de resultados	Microorganismos
Género <u>Bacillus</u>	1.-	<u>Bacillus subtilis</u>
	2.-	<u>Bacillus subtilis ATCC 6051</u>
	3.-	<u>Bacillus subtilis var. niger</u>
	4.-	<u>Bacillus pumilus</u>
	5.-	<u>Bacillus licheniformis ATCC 9945</u>
	6.-	<u>Bacillus licheniformis ATCC 9259</u>
	7.-	<u>Bacillus licheniformis ATCC 9980</u>
	8.-	<u>Bacillus cereus</u>
	9.-	<u>Bacillus cereus ATCC 11778</u>
	10.-	<u>Bacillus anthracis</u>
	11.-	<u>Bacillus megaterium</u>
	12.-	<u>Bacillus megaterium ATCC 10778</u>
	13.-	<u>Bacillus polymyxa</u>
	14.-	<u>Bacillus macerans ATCC 8309</u>
	15.-	<u>Bacillus circulans</u>
	16.-	<u>Bacillus circulans ATCC 9966</u>
	17.-	<u>Bacillus steorothermophilus</u>
	18.-	<u>Bacillus coagulans</u>
	19.-	<u>Bacillus firmus</u>
	20.-	<u>Bacillus sphaericus ATCC 4978</u>
Género <u>Clostridium</u>	21.-	<u>Clostridium histolyticum</u>

- 22.- Clostridium novyi
 23.- Clostridium perfringens
 24.- Clostridium chauvoei
 25.- Clostridium septicum
 26.- Clostridium septicum BMB59

Género Lactobacillus

- 27.- Lactobacillus delbrueckii
 28.- Lactobacillus leichmannii
 29.- Lactobacillus bulgaricus
 30.- Lactobacillus casei
 31.- Lactobacillus casei var. rhamnosus
 32.- Lactobacillus plantarum
 33.- Lactobacillus plantarum ATCC 8014
 34.- Lactobacillus arabinosus

Género Listeria

- 35.- Listeria monocytogenes

Los microorganismos que presentan diferencias son:

I)

- | | | |
|-----------|---|---|
| Cuadro 16 | <u>Bacillus circulans</u> ATCC 9966 | Manitol +, debe ser - . |
| Cuadro 20 | <u>Bacillus sphaericus</u> ATCC 4978 | Xilosa +, debe ser - . |
| Cuadro 27 | <u>Lactobacillus delbrueckii</u> | Celobiosa +d, debe ser - . |
| Cuadro 30 | <u>Lactobacillus casei</u> | Esculina -, debe ser + . |
| Cuadro 31 | <u>Lactobacillus casei var.</u>
<u>rhamnosus</u> | Melezitosa -, debe ser + . |
| Cuadro 34 | <u>Lactobacillus arabinosus</u> | Ramnosa +, debe ser - . |
| Cuadro 35 | <u>Listeria monocytogenes</u> | Maltosa -, debe ser + .
Xilosa +, debe ser - . |

Estas cepas presentan variaciones en la prueba de fermentación de carbohidratos. Estas alteraciones se pueden deber a mu

taciones en el genoma bacteriano que permita o inhiba, según el caso, la producción de una enzima necesaria para que se realice la ruta metabólica que lleva la producción de ácido a partir del carbohidrato estudiado, o a fenómenos de adaptación.

Estas variaciones no son significativas, ya que en el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 8a Edición, se indica que las pruebas tanto positivas como negativas, lo son del 90 al 100% de las cepas, abriéndose la posibilidad de variación en el 10% de ellas. Dentro de este porcentaje pueden estar incluidas las cepas antes mencionadas.

II)

Cuadro 3. Bacillus subtilis var. niger No produce pigmento.

Una de las características de esta variedad de Bacillus subtilis, es la producción de un pigmento negro en medios -- que contengan tirosina. En la literatura se indica que dicho pigmento es inestable (6), lo cual explica esta variación.

Esta bacteria se registró como Bacillus subtilis var. niger debido a que se obtuvo a partir de una mezcla de esporas conservadas en papel filtro, en la que se indicaba que pertenecía a la variedad mencionada. Si se hubiera aislado de otra fuente, al no producir el pigmento no se habría registrado como variedad niger.

III)

Cuadro 6. Bacillus licheniformis ATCC 9259 Citrato de Sim--
mons, dió -, de-
be ser + .

Cuadro 8. Bacillus cereus Citrato de Sim--
mons, dió -, de-
be ser +.

Esta alteración se puede deber a mutaciones o daptacio-
nes que inhiban la producción de una enzima necesaria para -
que se realice la utilización del citrato como única fuente
de carbono, o el aprovechamiento de las sales de amonio como
única fuente de nitrógeno.

Esta variación no es significativa ya que en el "Bergey's
Manual of Determinative Bacteriology" 8a. Edición, se indica
que la prueba es positiva, en el 90 al 100% de las cepas, --
abriéndose la posibilidad de variación en el 10% y en este -
porcentaje pueden estar incluidos: Bacillus licheniformis --
ATCC 9259 y Bacillus cereus.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La liofilización es un proceso adecuado para conservar estas cepas puesto que la viabilidad después del proceso se mantuvo en niveles óptimos para la mayoría de las cepas (78%) y muy buenos para las demás.
- Se obtuvo una subcolección de bacilos Grampositivos que incluye 4 géneros, 35 especies y 2 variedades.
- Las cepas liofilizadas, junto con la información concerniente a sus características bioquímicas y de cultivo se encuentran en el Cepario de la Facultad de Química de la U.N.A.M. y están a disposición de profesores, investigadores, tesisistas y alumnos que las soliciten para la realización de sus prácticas o trabajos experimentales.
- Estas cepas podrán usarse tanto en algunas materias que se imparten en la Facultad, como para brindar apoyo a otras Instituciones de Investigación, docencia e industria.

A N E X O S

ANEXO 1

Medios de Cultivo

La composición de los medios que a continuación se describen está dada en g/l .

1 AGUA PEPTONADA

Peptona		5.0
Nitrato de potasio	de	0.2 a 2.0
Agua destilada		1000 ml

PREPARACION:

Se disuelven la peptona y el nitrato en el agua destilada, distribuyéndose en tubos que tienen en su interior un tubo invertido de Durham; se esterilizan en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión por 15 min. Se realiza prueba de esterilidad del medio.

2 ALMIDON AGAR

Peptona de gelatina		5.0
Extracto de carne de res		3.0
Almidón soluble		2.0 a 10.0
Agar		15.0
pH final		6.8

PREPARACION:

Se disuelven los componentes en el agua destilada y se calienta hasta ebullición, manteniéndose así durante un minuto. Se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión,

durante 15 minutos. Se deja enfriar a $\pm 50^{\circ}\text{C}$ y se vacía a cajas en condiciones de esterilidad.

Se realiza prueba de esterilidad.

3. ANAEROBICO AGAR

Peptona de caseína	17.5
Peptona de soya	2.5
Cloruro de sodio	2.5
L - cistina	0.4
Dextrosa	10.0
Agar	15.0
Tioglicolato de sodio	2.0
Formaldehído de sulfoxilato sódico	1.0
Azúl de metileno	0.002
pH final	7.2 ± 0.2

PREPARACION:

Se hace una suspensión con 51 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Se deja reposar durante 5 minutos y se mezcla totalmente. Cuando se obtiene una suspensión uniforme, se calienta ligeramente, agitando frecuentemente la mezcla hasta que hierva durante un minuto. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C , a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Se realiza prueba de esterilidad.

4. AOAC AGAR

Leche peptonizada	15.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	10.0
Jugo de tomate	5.0 (100 ml)
Fosfato monobásico de potasio	2.0
Tween 80	1.0
Agar	10.0
pH final	6.8 ± 0.2

PREPARACION:

Se hace una suspensión con 48 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Se mezclan los componentes hasta obtener una suspensión uniforme, se calienta ligeramente, agitando hasta que la mezcla hierva durante un minuto. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C , a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Se realiza prueba de esterilidad.

5. ARGININA CALDO DE

D. (+)-glucosa	0.5
Fosfato dipotásico	2.0
Triptona	5.0
Extracto de levadura	2.5
Arginina monohidrocloreada	3.0
pH final	7.0

PREPARACION:

Se disuelven los componentes de este medio en un litro de agua destilada. Se distribuye en tubos y se esteriliza a

121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

6. CARBOHIDRATOS MEDIO BASE PARA

Peptona	5.0
Extracto de levadura	3.0
Agar	3.0
Púrpura de bromocresol	0.008
Carbohidrato	5.0 a 10.0
pH final	7.0

PREPARACION:

Se disuelven los componentes en un litro de agua destilada, y se calienta, agitando suavemente hasta su disolución total. Se checa el pH y se ajusta si es necesario con una solución de ácido clorhídrico o con una solución de hidróxido de sodio ya sea que el medio este básico o ácido respectivamente. Se distribuye el medio en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

Antes de inocular este tipo de medio, se debe volver a checar el pH, si éste ha variado se ajusta con una solución de ácido clorhídrico estéril o con una solución de hidróxido de sodio estéril, según haya sido la variación.

7. CARNE LEVADURA MEDIO DE

Peptona tripticaseína	10.0
-----------------------	------

Cloruro de sodio	5.0
Extracto de carne	2.0
Extracto de levadura	5.0
Clohidrato de cisteína	0.3
Agar	7.0
Sulfato ferroso	0.2
Hiposulfito de sodio	0.3
pH final	7.0

PREPARACION:

Se disuelven los componentes en un litro de agua destilada, y se calienta, agitando suavemente hasta su disolución total. Se checa el pH y se ajusta si es necesario con una solución de ácido clorhídrico o con una solución de hidróxido de sodio ya sea que el medio este básico o ácido respectivamente. Se distribuye el medio en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos.

Se realiza prueba de esterilidad.

8. CISTINA TRIPTICASEINA MEDIO DE

L-cistina	0.5
Peptona de caseína	20.0
Agar	2.5
Cloruro de sodio	5.0
Sulfito de sodio	0.5
Rojo de fenol	0.017
Carbohidrato	5.0 a 10.0
pH final	7.3

PREPARACION:

Se disuelven los componentes en un litro de agua destilada, y se calienta, agitando suavemente hasta su disolución total. Se chequea el pH y se ajusta si es necesario con una solución de ácido clorhídrico o con una solución de hidróxido de sodio ya sea que el medio este básico o ácido respectivamente. Se distribuye el medio en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos.

Se realiza prueba de esterilidad.

Antes de inocular este medio, se debe de volver a chequear el pH, si éste ha variado se ajusta con una solución de ácido clorhídrico estéril o con una solución de hidróxido de sodio estéril, según haya sido la variación.

9. CITRATO DE SIMMONS AGAR

Sulfato de magnesio	0.2
Fosfato de amonio	1.0
Fosfato dipotásico	1.0
Citrato de sodio	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
Azúl de bromotimol	0.08
pH final	6.8

PREPARACION:

Se suspenden 24.2 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Se deja remojar durante 10 minutos. Se mezcla bien y se calienta suavemente agitando, hasta que el medio -

hierva durante un minuto. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos.

Se realiza prueba de esterilidad.

10. CLOSTRIDIUM AGAR SELECTIVO PARA

Peptona de caseína	17.0
Peptona de harina de soya	3.0
D (+)-glucosa	6.0
Cloruro de sodio	2.5
Tioglicolato de sodio	1.8
L-cistina	0.25
Sulfoxilato de formaldehído de sodio	1.0
Sulfato de neomicina	0.15
Azida de sodio	0.2
Agar	12.0
pH final	7.0 ± 0.2

PREPARACION:

Se suspenden 46 gramos del polvo en un litro de agua -- destilada, Se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente, dejando que hierva durante un minuto. Se esteriliza a 118°C durante 15 minutos en autoclave. Se deja enfriar a ± 50°C y se vierte en cajas de Petri estériles.

11. DEXTROSA SABOURAUD CALDO

Dextrosa	40.0
Peptona-polipeptona	10.0
pH. final	5.6

PREPARACION:

Se disuelven 55 gramos del polvo en un litro de agua -- destilada. Se calienta ligeramente, si es necesario, para obtener la solución. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 118°C, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

12. FENILALANINA MEDIO DE

DL-fenilalanina	2.0
Extracto de levadura	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	1.0
Agar	12.0

pH final 7.3

PREPARACION:

Se disuelven los componentes de este medio en un litro de agua destilada. Se calienta suavemente la solución, se distribuye en tubos y se esteriliza a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

13. GELATINA NUTRITIVA

Peptona	5.0
Extracto de carne de res	3.0
Gelatina	120.0

pH final 6.8

PREPARACION:

Se suspenden los componentes en un litro de agua desti-

lada, se mezclan bien y se calienta agitando frecuentemente hasta la disolución total de la gelatina. Se distribuye en tubos y se esteriliza a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos.

Se realiza la prueba de esterilidad.

14. GELATINA TIOGLICOLATO MEDIO DE

Casitona	15.5
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	2.0
Cloruro de sodio	2.5
L-cistina	0.25
Sulfito de sodio	0.1
Tioglicolato ácido	0.3 ml
Agar	0.75
Gelatina	50.0
pH final	7.0

PREPARACION:

Se suspenden los componentes en un litro de agua destilada, se mezclan bien y se calienta agitando frecuentemente hasta la disolución total de la gelatina. Se distribuye en tubos y se esteriliza a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza la prueba de esterilidad.

15. GLUCOSA FOSFATO CALDO DE

D(+)-glucosa	5.0
Fosfato dipotásico	5.0

Peptona 5.0

pH final 7.5

PREPARACION:

Se disuelven los componentes en un litro de agua destilada, se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 118°C, durante 15 minutos. Se realiza la prueba de esterilidad.

16. INDOL NITRITO MEDIO DE

Peptona de caseína 20.0

Fosfato disódico 2.0

Dextrosa 1.0

Agar 1.0

Nitrato de potasio 1.0

pH final 7.2 ± 0.2

PREPARACION:

Se agregan 25 gramos del polvo a un litro de agua destilada, se mezcla bien y se añaden 2.0 gramos de agar, se va a utilizar para pruebas de movilidad y de determinación de gas. Se calienta agitando frecuentemente y se deja hervir durante 1 minuto. Se distribuye en tubos llenándolos hasta la mitad y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

17. INFUSION CEREBRO CORAZON AGAR

— Igual composición que infusión cerebro corazón caldo con 15.0 g. de agar.

PREPARACION:

Se hace una suspensión con 52 gramos de material deshidratado en un litro de agua destilada, se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente hasta ebullición, manteniéndose así durante un minuto. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

18. INFUSION CEREBRO CORAZON CALDO

Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión de corazón de res	250.0
Mezcla de peptonas	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5
Dextrosa	2.0
pH final	7.4

PREPARACION:

Se agregan 37 gramos del polvo a un litro de agua destilada. Se mezcla bien y se calienta ligeramente, si es necesario para disolverlo. Se distribuye en tubos, y se esteriliza a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

19. HIPURATO DE SODIO CALDO DE

Hipurato de sodio	10.0
Caldo de infusión cerebro corazón	1000 ml

PREPARACION:

Se disuelve la sal en el caldo y posteriormente se este

riliza a 15 lb de presión y a 121 °C por 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad al medio. Una vez preparado el caldo de hipurato, se marca en cada tubo el nivel del medio con un lápiz marcador. Si durante el almacenamiento e incubación del medio ocurre la evaporación de éste, cambia la concentración del hipurato pudiendo haber falsos positivos, por lo que antes de realizar la prueba se debe nivelar el medio hasta la marca con agua destilada.

20 JUGO DE TOMATE AGAR

Jugo de tomate	20.0 (400ml)
Peptona	10.0
Leche peptonizada	10.0
Agar	11.0
pH final 6.1 ± 0.2	

PREPARACION

Se hace una suspensión con 51 gramos de material deshidratado en un litro de agua destilada. Se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente y se deja hervir durante un minuto. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza la prueba de esterilidad.

21. LECHE DESCREMADA

PREPARACION:

Se disuelven 100 gramos en un litro de agua destilada. Se distribuye y se esteriliza en autoclave a 118°C, durante

10 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

22. LECHE TORNASOL

pH final 6.8

PREPARACION:

Se agregan 100 gramos del polvo a un litro de agua destilada, de preferencia precalentada a 50°C. Se mezcla bien hasta obtener una suspensión uniforme, Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 115°C, durante 20 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

23. LEE MEDIO DE

Triptona	10.0
Extracto de levadura	10.0
Lactosa	5.0
Sacarosa	5.0
Carbonato de calcio	3.0
Fosfato dipotásico	0.5
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar	18.0
pH final 7.0 ± 0.2	

PREPARACION:

Se agregan los componentes a un litro de agua destilada se mezclan bien y se calienta agitando frecuentemente hasta que hierva, manteniéndose así durante un minuto. Se distri-

buye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

24. MEDIO 1

Extracto de carne	1.5
Extracto de levadura	3.0
Casitona	4.0
Peptona	6.0
Dextrosa	1.0
Agar	15.0

pH final 6.6 ± 0.1

PREPARACION:

Se agregan los componentes a un litro de agua destilada, se mezclan bien y se calienta agitando frecuentemente -- hasta que hierva, manteniéndose así durante un minuto. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

25. MICROINOCULO AGAR

Igual composición que microinóculo caldo con 20.0 g de agar.

PREPARACION:

Se agregan los componentes a un litro de agua destilada

se calienta suavemente, si es necesario, para disolver por completo. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

Si el medio se encuentra ya preparado, se disuelven 37 gramos del polvo en un litro de agua destilada y se esteriliza como ya se indicó.

27. MRS MEDIO

Peptona	10.0
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Glucosa	20.0
Tween 80	1.0 ml
Fosfato ácido de potasio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Triacetato de sodio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.2
pH final	6.2 a 6.6

PREPARACION:

Se agregan los componentes a un litro de agua destilada, se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente hasta que hierva, manteniéndose así durante un minuto. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

28. NUTRITIVO AGAR

Igual composición que nutritivo caldo con 15.0 g de agar

PREPARACION:

Se disuelven 23 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada y se calienta agitando frecuentemente hasta que hierva, manteniéndose así durante un minuto. Se distribuye y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

29. NUTRITIVO CALDO

Peptona de gelatina	5.0
Extracto de levadura	3.0
pH final	6.8

PREPARACION:

Se disuelven 8 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Si es necesario se calienta suavemente para disolverlo. Se distribuye en tubos y se esteriliza a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

30. OXIDACION-FERMENTACION MEDIO BASAL DE

Tripticasa o Triptona	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	0.3

Agar	2.5
Azúl de bromotimol	0.03
pH final	7.1 ± 0.2

PREPARACION:

Se pesan cuidadosamente las cantidades, después se rehidrata el medio con un litro de agua destilada y finalmente se calienta hasta su disolución total. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C , a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Adición del carbohidrato. La adición del carbohidrato se puede llevar a cabo de dos maneras:

1. Se prepara una solución acuosa al 10% del carbohidrato y se esteriliza por el método de filtración con ayuda de una membrana Millipore. Posteriormente a una alícuota de 100 ml del filtrado del carbohidrato estéril (al 10%) para tener una concentración final de carbohidrato igual a 1%. Después se distribuyen 5 ml en cada tubo asépticamente. Se realiza prueba de esterilidad.
2. Se adiciona el carbohidrato deseado en una concentración del 1% al medio base antes de la esterilización. Se distribuye en tubos. Se esteriliza en autoclave a 118°C , durante 10 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

31. SANGRE BASE DE AGAR

Infusión de músculo cardíaco	375.0
Peptona de carne	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
Eritrocitos de carnero 8 al 10 %	
pH final	7.3

PREPARACION:

Se hace una suspensión con 40 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Se deja reposar durante 5 minutos y se mezcla hasta obtener una suspensión uniforme. Se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante un minuto. Se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 20 minutos.

Al agar esterilizado, fundido y enfriado a 45°C, se aña de sangre desfibrinada estéril al 10 % y se hace rotar suavemente hasta que la sangre esté uniformemente mezclada con el medio. Después se vacía a cajas de Petri estériles.

32. SIM MEDIO DE CULTIVO

Peptona de caseína	20.0
Peptona de carne	6.6
Citrato de amonio y hierro III	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.0
pH final	7.3 ± 0.1

PREPARACION:

Se rehidratan 30 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada, se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente y se deja hervir durante un minuto. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión por 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad

33. SOYA TRIPTICASEINA AGAR DE

Peptona de caseína.	15.0
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0

pH final 7.3

PREPARACION:

Se suspenden 40 gramos del polvo en un litro de agua -- destilada. Se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente y se deja hervir durante un minuto. Después de que se haya disuelto, se distribuye en tubos y se esteriliza en -- autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. -- Se realiza prueba de esterilidad.

34. SOLUCION SALINA ISOTONICA

Cloruro de sodio	8.5
------------------	-----

pH final 7.0

PREPARACION:

Se disuelve la sal en un litro de agua destilada, agi--tando y una vez disuelta, se distribuye y esteriliza en auto

clave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos.

35. TIOGLICOLATO DE BREWER MEDIO DE

Infusión de carne	500.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	2.0
Peptona proteosa	10.0
Dextrosa	5.0
Tioglicolato de sodio	0.5
Agar	0.5
Azúl de metileno	0.002
pH final	7.0

PREPARACION:

Se hace una suspensión con 38.5 gramos del medio deshidratado en agua destilada. Se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente hasta ebullición, manteniéndose así durante un minuto. Se distribuye en tubos de ensayo llenándolos hasta la mitad y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

36. TIOGLICOLATO 135-C MEDIO DE

Peptona de caseína	15.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	6.0
Cloruro de sodio	2.5
Tioglicolato de sodio	0.5

L-cistina	0.5
Sulfito de sodio	0.1
pH final	7.0

PREPARACION:

Se hace una suspensión con 30 gramos del medio deshidratado en agua destilada. Se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente hasta ebullición, manteniéndose así durante un minuto. Se distribuye en tubos de ensayo llenándolos hasta la mitad.

Para la conservación de cultivos, especialmente de los tipos altamente fermentativos, se coloca una pequeña cantidad (aproximadamente 0.1 g) de CaCO_3 en cada tubo antes de introducir el líquido.

Se esteriliza en autoclave a 121°C , a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

37. TIGLICOLATO MEDIO LIQUIDO DE

Peptona de caseína	15.0
L-cistina	0.5
Dextrosa anhidra	5.0
Extracto de levadura	5.0
Cloruro de sodio	2.5
Tioglicolato de sodio	0.5
Resazurina	0.001
Agar	0.75
pH final	7.1

PREPARACION:

Se hace una suspensión con 30 gramos del medio deshidratado en agua destilada. Se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente hasta ebullición, manteniéndose así durante un minuto. Se distribuye en tubos de ensayo llenándolos hasta la mitad y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

38. TIGLICOLATO SIN DEXTROSA Y SIN INDICADOR MEDIO DE

Peptona de caseína	20.0
Cloruro de sodio	2.5
Fosfato dipotásico	1.5
Tioglicolato de sodio	0.6
L-cistina	0.4
Sulfito de sodio	0.2
Agar	0.5
pH final	7.2 ± 0.2

PREPARACION:

Se hace una suspensión con 25.7 gramos del medio deshidratado en agua destilada. Se mezcla bien y se calienta -- agitando frecuentemente hasta ebullición, manteniéndose así durante un minuto. Se distribuye en tubos de ensayo llenándolos hasta la mitad y se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad.

39. TRIPTICASEINA BASE DE AGAR

Peptona de caseína	20.0
Agar	3.5
Rojo de fenol	0.02
pH final	7.4 ± 0.2

PREPARACION:

Se suspenden 23.5 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente hasta que la mezcla hierva durante un minuto. Se agrega el carbohidrato y se ajusta el pH si es necesario con una solución de ácido clorhídrico ó con una solución de hidróxido de sodio ya sea que el medio esté básico ó ácido respectivamente. Se distribuye en tubos y se esteriliza a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se realiza la prueba de esterilidad.

40. UREA BASE DE AGAR

Peptona	1.0
Glucosa	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato monopotásico	2.0
Rojo de fenol	0.012
pH final	6.8 ± 0.1

PREPARACION:

Se pesan los componentes del medio y se disuelven en un litro de agua destilada. Se mezcla bien y se calienta agitan

do frecuentemente hasta que la mezcla hierva durante un minuto. Se distribuye en frascos de 200 ml y se esteriliza en autoclave a 121°C , a 15 lb de presión, durante 15 minutos.

Se prepara una solución al 29% de urea y se esteriliza por filtración a través de un filtro bacteriológico estéril.

Se añade la solución de urea estéril en una concentración final del 10% a los frascos que tienen la base de agar que previamente se licuó y enfrió a 50°C . Se mezcla bien y se distribuye asépticamente en tubos pequeños (de 13X100) en cantidades de 2 a 3 ml. Se pone a solidificar el medio en posición inclinada. Se realiza la prueba de esterilidad.

A N E X O 2

REACTIVOS

Reactivos para las pruebas de hidrólisis.

1) Hidrólisis de almidón:

Cristales de yodo	1.0 g.
Yoduro de potasio	2.0 g.
Agua destilada	300 ml.

Disolver el yoduro de potasio en el agua destilada. Tri
turar los cristales de yodo en 20 ml. de agua destilada en -
mortero.

Añadir el resto del agua (280 ml), revolver y pasar es-
ta solución a un frasco, tapanlo y agitar hasta disolución -
total.

Filtrar y guardar esta solución en un frasco ámbar.

2) Hidrólisis de Arginina:

Reactivo de Nessler:

Ioduro de potasio	70.0 g
Cloruro mercúrico	100.0 g
Hidróxido de potasio	100.0 g
Agua destilada	1000. ml

Se disuelven el ioduro de potasio y el cloruro mercúrico
en 400 ml de agua destilada. Se disuelve el hidróxido de po-

tasio en 500 ml de agua destilada y se enfría. Se mezclan las dos soluciones y se aforan a 1000 ml. Se deja que sedimente el precipitado, se decanta el sobrenadante claro en un frasco reactivo y se desecha el precipitado.

3) Hidrólisis de Hipurato:

Cloruro férrico	12.0 g
Acido clorhídrico	2 ml
Agua destilada	100 ml

Se disuelven 12 g de cloruro férrico, en 100 ml de una solución acuosa al 2 % de ácido clorhídrico.

4) Prueba de la catalasa:

Peróxido de hidrógeno (10 Volúmenes)

5) Desaminación de la fenilalanina:

Cloruro férrico	10.0 g
Agua destilada	100 ml

Se disuelven 10 g de cloruro férrico en 100 ml de agua destilada.

6) Producción de acetoina:

Alfa-naftol	6.0 g
Hidróxido de potasio	16.0 g
Etanol	100 ml.
Agua destilada	100 ml

Se prepara una solución etanólica al 6% de α -naftol, (no usar después de 48 hrs.) y una solución al 16% de hidróxido de potasio.

7) Reducción de Nitratos:

Acido sulfanílico	8.0 g
Alfa-naftilamina	5.0 g
Acido acético 5N	2000 ml

Reactivo 1: Se disuelven 8 g. de ácido sulfanílico en 1000 ml de ácido acético 5 N

Reactivo 2: Se disuelven 5 g. de alfa-naftilamina en 1000 ml de ácido acético 5 N.

8) Sulfhídrico, Indol, Movilidad (SIM):

Reactivo de Ehrlich:

p-Dimetilaminobenzaldehído	2.0 g
Alcohol etílico absoluto	190 ml
Acido clorhídrico concentrado	40 ml

Se disuelve el p-Dimetilaminobenzaldehído en el alcohol etílico y el ácido clorhídrico.

Reactivos de Tinciones.

1) Tinción de esporas

Carbolfucsina
Etanol al 95%
Nigrosina

Carbolfucsina.-

Fucsina básica	5.0 g
Fenol (cristalizado)	25.0 g
Etanol al 95%	50.0 ml
Agua destilada	500.0 ml

Se disuelve la fucsina y el fenol, colocándolos en un matraz, el cual se pone en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Cuando se disuelve totalmente el colorante, se deja enfriar, se añade el etanol, se mezcla vigorosamente y después se añade el agua destilada. Se debe de filtrar antes de usarlo.

Nigrosina.-

Nigrosina	10.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Se suspende la nigrosina en el agua destilada y se hierve durante 30 minutos, se deja enfriar y se filtra.

2) Tinción de Gram.

Solución de cristal violeta oxalato de amonio.

Solución yodo-yodurada de Lugol

Agente decolorante

Colorante de contraste.

Solución de cristal violeta oxalato de amonio:

Solución 1: Se disuelven 2.0 g de cristal violeta en 20.0 ml de alcohol etílico al 95%.

Solución 2: Se disuelven 0.8 g de oxalato de amonio en 80 ml de agua destilada

Se disuelve la solución 1 en 4 partes de agua destilada y se mezcla con una cantidad igual de solución 2.

Solución yodo-yodurada de Lugol:

Se disuelve 1 g de yodo y de 3.5 g de yoduro de potasio en 300ml. de agua destilada. Se deja reposar esta solución por 24 horas. Se diluye 1:15.

Agente decolorante:

Se mezclan 250 ml de alcohol etílico al 95 % con 250 ml de acetona.

Colorante de contraste: solución diluida de safranina.

Se disuelven 2.5 g de safranina en 100 ml de alcohol -- etílico al 95%. Posteriormente se mezclan 25 ml. de esta solución con 75 ml. de agua destilada.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A

1. Bailey Robert, Elvyn G. Scott
"Diagnostic Microbiology"
4th Edition
The C.V. Mosby Company
Saint Louis, 1974
2. BBL
"Manual de procedimientos en laboratorios y de productos"
Becton, Dickinson de México, S.A. de C.V.
México, 1971.
3. Bojalil J., G. Santoscoy., Manuel Rodríguez.
"Microbiología Médica"
Francisco Méndez Oteo
Tomo I
4. Breed R.S. and C.S. Peterson
"The Organisms Causing Rusty Spot in Cheddar Cheese"
J. of Bacteriol.
Vol. 36
1938
5. Buchanan R.E. & N.E. Gibbons CO-Editors.
"Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"
7 th Edition
Williams & Wilkins
Baltimore MD. U.S.A., 1957
6. Buchanan R.E. & N.E. Gibbons Co-Editors.
"Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"
8 th Edition.
Williams & Wilkins
Baltimore MD. U.S.A., 1974
7. Burdon L. Kenneth, Robert P. Williams.
"Microbiología"
2a. Edición
Publicaciones Cultural S.A.
México, 1976.
8. Burrows William
"Tratado de Microbiología"
20a. Edición.
Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V.
México, 1974.

9. Davis B.D., R. Dulbecco, N.H. Eisen, S.H. Ginsberg,
B.W. Wood.
"Microbiology"
2cond Edition
Harper & Row, Publishers, Inc.
U.S.A. 1973
10. DIFCO
"Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents -
for Microbiological and Clinical Laboratory Proce-
dures"
9th Edition
Detroit Michigan, U.S.A. 1953
11. Donk P.J.
"A highly resistant thermophilic organism"
J. of Bacteriol.
Vol. 5
1920
12. Frazier W.C.
"Microbiología de Alimentos"
2a Edición.
Editorial Acribia
España, 1972.
13. Frobisher Martin, Robert Fuerst.
"Microbiología"
13a. Edición.
Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V.
México, 1976
14. Frobisher M., R.D. Hisdill, K.T. Grabtree, C.R.
Goodheart.
9 th Edition.
W.B. Saunders Company
U.S.A., 1974
15. Hammer B.W.
"Bacteriological Studies on the Coagulation of Eva-
porated Milk"
Resch. Bull. Iowa Agric. an Hom Econ. Exp. Stat.
Vol. 19
1915
16. Hansen P.A.
" Lactobacillus bulgaricus and its relationships"
Ernährungsforschung.
Vol. 10
1966
17. Hansen P.A. and F.E. Lessel.
"Lactobacillus casei (Orla-Jensen) Comb. Nov."
Int. J. of Syst. Bacteriol.
Vol. 21, Num. 1
1971

18. Harrison P.A. and P.A. Hansen
"A Motile Lactobacillus from Cecal Feces of Turkeys"
J. of Bacteriol.
Vol. 59, Num. 4
1950
19. Harrison P.A. and P.A. Hansen.
"Lactobacilli from Turkeys"
J. of Bacteriol.
Vol. 60, Num. 5
1950.
20. Hofherr Louise
"Microbiology Problem"
Am. J. of Med. Tech.
Vol. 44, Num. 9
1978
21. Jacobs Morris Boris
"Handbook of Microbiology"
Princeton, N.J. Van Nostrand
1960.
22. Jawets E., L. Melnick, E.A. Adelberg.
"Manual de Microbiología Médica"
6a. Edición.
Manual Moderno
México, 1975
23. Mac. Faddin Jean F.
"Biochemical Tests for Identification of Medical -
Bacteria"
2cond Edition
Waverly Press, Inc.
Baltimore MD. U.S.A. 1980
24. Meynell G.G., Elinor Meynell
"Bacteriología Experimental"
1a Edición
Ediciones Omega, S.A.
Barcelona, 1969
25. Nakayama O. and. M. Yanashi
"Taxonomic Studies on Bacillus Laevolacticus Nov. Sp.
and Bacillus Racemilacticus Nov. Sp."
J. of Gen. and Appl. Microbiol.
Vol. 13
1967
26. Rogosa M.
"Experimental Conditions for Nitrate Reduction by
Certain Strains of Genus Lactobacillus"
J. of Gen. Microbiol.
Vol. 24, Num. 3
1961

27. Rogosa M. and P.A. Hansen
 "Nomenclatural Considerations of Certain Species -
 of Lactobacillus Beijerinck"
Int. J. of Syst. Bacteriol.
 Vol. 21, Num. 2
 1971
28. Rogosa M. and M.E. Sharpe.
 "An Approach to the Classification of the Lactoba-
cilli"
J. of Appl. Bacteriol.
 Vol. 22, Num 3
 1959
29. Rogosa M., J.G. Franklin and K.D. Perry
 "Correlation of the Vitamin Requirements with Cul-
 tural and Biochemical Characters of Lactobacillus
spp"
J. of Gen. Microbiol.
 Vol. 25, Num. 3
 1961
30. Rogosa M., R.F. Wiseman, J.A. Mitchell and M.N. Dis-
 raely.
 "Species Differentiation of Oral Lactobacilli from
 Man, Including Descriptions of Lactobacillus sali-
varius Nov. Spec."
J. of Bacteriol.
 Vol. 65, Num. 6
 1953
31. Salle A.J.
 "Fundamental Principles of Bacteriology"
 7th Edition
 Mc. Graw-Hill Book Company
 U.S.A. 1971
32. Salle A.J.
 "Laboratory Manual on Fundamental Principles of --
 Bacteriology"
 5 th Edition.
 Mc. Graw-Hill Book Company
 U.S.A. 1961
33. Scott J.P.
 "The Etiology of Blackleg and Methods of Differentia-
 ting. Clostridium chauvoei from other Anaerobic Orga-
 nisms
 Found in Cases of Blackleg"
 Corn. Vet.
 Vol. 18
 1928

34. Skinner F.A., D.W. Lovelock
"Identification Methods for Microbiologists"
2cond. Edition
Academic Press
London, 1979
35. Wistreich A. George, Max D. Lechtman.
"Laboratory Exercises in Microbiology"
4th. Edition
Glencoe Publishing Company, Inc.
London, 1980.