

2 Ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**CUAUTITLAN**

**CIENCIAS QUIMICAS**



**“ESTUDIO DE MATERIAS PRIMAS PARA LA FORMULACION  
DE MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN EL  
DESARROLLO MICROBIANO”**

**TESIS PROFESIONAL**

**PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

**P R E S E N T A**

**LEON MIGUEL ALCOCER BRAVO**

1984



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.

## CONTENIDO.

	Pág.	
1.0.0	INTRODUCCION.	1
1.1.0	ANTECEDENTES.	1
1.2.0	GENERALIDADES.	5
1.2.1	Agua.	7
1.2.2	Compuestos orgánicos de crecimiento.	10
1.2.3	Compuestos inorgánicos de crecimiento.	20
1.2.4	Temperatura.	28
1.2.5	pH.	38
1.2.6	Curvas de crecimiento.	41
2.0.0	OBJETIVO.	48
3.0.0	MATERIAL Y METODO.	49
4.0.0	RESULTADOS.	59
5.0.0	DISCUSIONES.	116
6.0.0	CONCLUSIONES.	125
7.0.0	BIBLIOGRAFIA.	126
8.0.0	RESUMEN.	129

## 1.0.0 INTRODUCCION.

### 1.1.0 Antecedentes.

Una de las inquietudes del hombre en las que se ha tenido que volver un cazador, ha sido la investigación de ese vasto - universo que es la microbiología, para lo cual el ingenio y el estudio se han hecho presentes para penetrar en dicho universo microscópico, dando como resultado desde el lente de Antonio - Van. Leeuwenhoek hasta los más sofisticados microscopios y medios de cultivo.

En los últimos siglos se creía que los organismos vivos - podían originarse espontáneamente al descomponerse la sustancia orgánica, descartándose lo anterior cuando Redi demostró que las larvas no aparecían en la carne descompuesta, siempre y cuando ésta fuera protegida de la deposición de huevos por las moscas.

Los cuidadosos experimentos de Spallanzani (1729-1799), que introdujo el uso de medios de cultivo estériles demostraron que un líquido putrescible, tal como una infusión de carne, podía conservarse indefinidamente si se hervía y se tapaba bien. En 1837, Schwann demostró que podían obtenerse resultados similares aunque se permitiera entrar aire en el recipiente donde se conservaban los alimentos, siempre que éstos fueran tapados convenientemente y que el aire pasara a través de un tubo calentado.<sup>(1)</sup>

Schoeder y Van Dusch introdujeron el uso de un tapon de - algodón, el cual se emplea aún para excluir de los medios de - cultivo las sustancias contaminantes que hay en el polvo atmosférico. Louis Pasteur (1855-1895) demostró que un medio hervido podría permanecer estable en un frasco no cerrado en forma de cuello de cisne, abierto al aire a través de un tubo horizontal en forma sinusoidal, en el cual las partículas de polvo sedi

mentaba (o bien eran atrapadas por la humedad de condensación), a medida que el aire entraba en la vasija enfriada. Pasteur demostró también que en la atmósfera de un sótano o de la cima de una montaña, que se hallaban relativamente libres de polvo, - podrían abrirse los frascos y volverse a cerrar, con gran posi bilidad de que no se produjera la contaminación. Las aporta-- ciones de Pasteur no fueron en principio más decisivas que las de sus predecesores, los cuales habían obtenido también medios de cultivo estériles y estables. El entusiasmo y la habilidad de Pasteur como polemista contribuyeron en gran manera a abo-- llir el fantasma de la generación espontánea. Por último John Tyndall, físico británico que se hallaba interesado en los efectos ópticos del polvo atmosférico y que a través de este tema tomó parte en la polémica de la generación espontánea, demostró que existían varios materiales que no se podían esterilizar me diante ebullición, concluyó finalmente que en los materiales contaminados existía un microorganismo que sobrevivía a la ebul lición durante horas (Bacillus subtilis). En el mismo año - (1877), Ferdinand Cohn demostró la existencia de formas resisten tes tan pequeñas como las endosporas e indicó que estos microorganismos constituían etapas del ciclo de vida del bacilo del heno (Bacillus subtilis). Sin embargo, hasta las esporas bacterianas más resistentes son rápidamente esterilizadas en presencia de humedad a 121<sup>o</sup>C. De aquí que el autoclave que al canza esta temperatura y en la cual se usa vapor bajo presión se haya convertido en pieza fundamental del laboratorio de bacter iología. (2)

Ante esta insaciable necesidad de conocer, el hombre se topó con su primer gran obstáculo que fue el de tener un medio propicio para que el microorganismo, tema de estudio tuviera un sitio en donde crecer y donde el investigador pudiera dirigir sus observaciones. Las preguntas que se debieron de haber hecho posiblemente fueron; ¿en donde crecen los microorganismos y que hay de especial en donde se reproducen?, De estas preguntas nacieron los primeros medios de cultivo, dando como resultado medios ricos para crecimiento y medios selectivos, y fue

asi como se fundaron las bases de la microbiología originando una industria con alta capacidad tecnologica, que son los actuales fabricantes de medios de cultivo deshidratados, utilizados en todas las ramas de la microbiología.

Esta industria ha llegado a México por medio de las industrias transnacionales las cuales ofrecen productos de alta calidad, basada en los componentes, regularmente de importación que constituyen sus medios de cultivo.

La actual crisis económica de nuestro país ha hecho necesario el cierre de las fronteras, lo cual trae por consecuencia la falta de materia prima de importación; aunado a todo esto, la industria productora de medios de cultivo se enfrenta a una serie de compañías nacionales que habiéndose declarado productoras no lo son y las que lo son ofrecen sus productos de baja o mala calidad.

Una de las soluciones dadas por la misma industria es la de buscar e investigar materias primas disponibles y útiles para la fabricación de medios de cultivo, el primer problema a vencer es el de desarrollar un interés por el estudio de materias primas utilizadas y por utilizar.

Las materias primas utilizadas en la elaboración de medios de cultivo son de origen animal y vegetal fundamentalmente. Las dificultades a las cuales estan sujetos los procesos de producción hacen que en México la elaboración sea de mala calidad a causa de una falta de control químico-microbiológico durante la producción. Dichos procesos son la desecación, pulverización, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, digestión enzimática y extracciones acuosas.

Por otra parte la demanda de medios de cultivo se origina principalmente por el sector salud, ya que en el campo industrial el control microbiológico se esta empezando a desarrollar. Esto trae como consecuencia que la demanda de medios de cultivo

sea limitada y por lo tanto la elaboración de materia prima no deja una ganancia cuantiosa para los industriales debido a su alto costo de elaboración y su baja demanda.

La investigación de materias primas se sigue desarrollando a nivel internacional, por ejemplo: se empieza a trabajar con métodos adecuados para aislamiento de virus a partir de alimentos. Las técnicas de que se disponen no son lo suficientemente sensibles, requieren un laboratorio complejo y en algunos casos llevan consigo la observación prolongada de los cultivos celulares o de los animales inoculados. Por lo que se refiere a bacterias entéricas bien conocidas, todavía no se cuenta con buenos métodos para el aislamiento e identificación de algunos géneros, tal es el caso especialmente del género Shigella. Aún cuando se cuenta con técnicas serológicas para identificación de cepas enteropatógenas de E. coli, estas técnicas no se utilizan de modo general por los microbiólogos. En el presente trabajo se estudiarán los extractos y las peptonas que puedan ser utilizadas como nutrientes microbianos, que se distribuyen actualmente en el país y en el extranjero, pudiendo ser esta la base para determinar la calidad de los productos mencionados. Lo anterior podrá aportar soluciones en la autosuficiencia del país, en el renglón de medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos nocivos y benéficos al hombre y la naturaleza. Los cuales están directamente relacionados con la salud pública, la salud animal, la agricultura, la industria alimenticia y químico-farmacéutica. (3), (4), (5)

Durante mucho tiempo se ha tratado de experimentar con nuevas sustancias tanto para mejorar los medios de cultivo existentes como para reemplazar a algunos nutrientes considerados clásicos. Y es así como observamos que la investigación, en cualquier rama de la microbiología no cesa.

### 1.2.0 Generalidades.

Prácticamente casi todos los microorganismos, pero en particular las bacterias y los hongos, pueden cultivarse sobre sustratos nutritivos para el estudio de sus propiedades o para la utilización de ciertas características en condiciones controladas. (6),(7),(8),(9).

Ya que los diversos microorganismos exigen requisitos diversos al medio de cultivo, se necesita en el laboratorio micro biológico una serie de medios de cultivo especiales.

Los medios de cultivo fabricados a escala industrial tienen la ventaja de que queda garantizada la reproducibilidad de los resultados y de que son posibles análisis cuantitativos. La proliferación de bacterias es el resultado de una interacción compleja de diferentes sustancias alimenticias y principios activos, en la cual intervienen factores físico-químicos como temperatura, pH, potencial redox, etc. Para su crecimiento todos los microorganismos necesitan agua. Además deben estar en forma utilizable el carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, -- azufre, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, etc. (5),(9).

Estos elementos bases de la vida no son de gran utilidad si no siguen un orden el cual los hace ser útiles. Dicho orden nos dará una jerarquía de compuestos en la organización molecular de la célula, dando origen a biomoléculas caracterizadas por su especialización, idoneidad, sus dimensiones y estructura. Lo anterior nos ayudará a tener una mejor idea de la organización celular. (6)

Muchos microorganismos dependen además de oligoelementos como manganeso, molibdeno, cinc, cobre, cloro, etc.

Los microorganismos exigentes tienen necesidad de factores de crecimiento como vitaminas, purinas y otras sustancias que



no pueden sintetizar ellos mismos. (8)

Los microorganismos pueden clasificarse según sus necesidades de carbono. Los autótrofos precisan solamente de dióxido de carbono, mientras que los heterótrofos requieren que el carbono se encuentre en una forma reducida más compleja, tal como la glucosa. Los microorganismos pueden clasificarse también basándose en su fuente de energía: Los fotótrofos obtienen su energía de la luz mientras que los quimiótrofos la obtienen de las reacciones de oxidación-reducción. Las células que emplean reductores inorgánicos como donadores de electrones se llaman litótrofos, mientras que los que utilizan moléculas orgánicas son organótrofos. Los autótrofos fotosintéticos y los quimiorganótrofos, se alimentan mutuamente; Las células fotosintéticas emplean dióxido de carbono atmosférico y energía solar para sintetizar la glucosa y desprender oxígeno, mientras que las células quimiorganotróficas de los animales oxidan a la glucosa y a otros productos de la fotosíntesis a expensas de oxígeno molecular, para así liberar energía y dióxido de carbono. (8)

### 1.2.1 Agua.

Las bacterias necesitan, para crecer y multiplicarse, gran cantidad de agua en sus inmediaciones. El agua es el vehículo por la cual los materiales esenciales penetran en la célula y salen todos los desechos. No es sólo un reactor en procesos metabólicos sino que también es parte integrante del protoplasma. (8)

Las bacterias, igual que todas las demás células vivas contienen gran proporción de agua. Esta es el principal componente de las células y representa del 75 al 85 % del peso total. (5)

El agua a causa de su abundancia y ubicuidad era considerada con frecuencia un líquido inerte, meramente destinada a llenar espacios en los organismos vivos. Pero en realidad sabemos que el agua y los productos de su ionización, los iones hidroxilo e hidronio, son factores importantes en la determinación de la estructura y las propiedades biológicas de las proteínas, de los ácidos nucleicos, así como de las membranas de los ribosomas y de otros muchos componentes celulares. (8)

El punto de ebullición, tensión superficial, calor de vaporización y el de fusión del agua, son más elevados que el de otros hidrocarburos, como por ejemplo  $H_2S$  ó  $NH_3$ . (8)

El calor de vaporización es la cantidad de energía necesaria para superar las fuerzas de atracción entre moléculas adyacentes en un líquido. Los calores de vaporización de algunos líquidos en sus puntos de ebullición comparados con el calor de vaporización del agua se dan en la tabla 1.0 .

TABLA 1.0

LIQUIDO	Hvap. cal/g
Agua	540
Metanol	263
Etanol	204
n-propanol	164
Acetona	125
Benceno	94
Cloroformo	59

Estas propiedades indican que las fuerzas de atracción y su cohesión interna entre moléculas son relativamente elevadas.<sup>(8)</sup>

Cuando dos moléculas de agua se aproximan se establece una atracción electrostática, esto va acompañado por una redistribución de las cargas electrostáticas en ambas moléculas.<sup>(8)</sup>

Una unión electrostática compleja de esta clase se llama enlace de hidrógeno. Cada molécula de agua es capaz de unirse con 4 moléculas de agua, Fig.1 .

Los enlaces de hidrógeno se presentan entre cualquier átomo electronegativo como el oxígeno, nitrógeno, flúor y un átomo de hidrógeno unido covalentemente a otro átomo electronegativo.

La intensificación de las fuerzas de atracción por la cooperación de muchos enlaces débiles se llama cooperatividad. El enlace de hidrógeno cooperativo es una característica exhibida tanto por proteínas como por los ácidos nucleicos por ejemplo. El agua es un solvente mucho mejor que la mayor parte de los líquidos. El agua disuelve con facilidad compuestos no iónicos de carácter polar como azúcares, alcoholes, aldehidos y cetonas. Su solubilidad se debe a enlaces de hidrógeno con grupos funcionales polares.

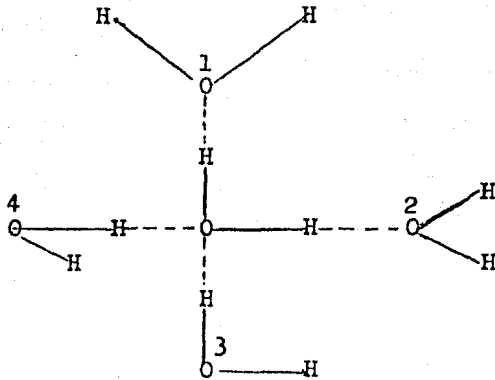


Fig.1, enlace tetraédrico de hidrógeno alrededor de una molécula de agua en el hielo. Las moléculas 1,2 y la molécula central se hallan en el plano del papel, la molécula 3 se halla por encima de el, y la molécula 4 detras del plano.

El agua dispersa ó solubiliza, formando micelas a los compuestos que contienen grupos simultáneos, fuertemente no polares y grupos fuertemente polares. Tales moléculas reciben el nombre de anfipáticas. En el interior de las micelas las interacciones de Van der Waals, aportan fuerzas de atracción, adicionales. Las interacciones hidrofóbicas son la asociación de las porciones hidrofóbicas de las moléculas anfipáticas que tienen a producir sistemas de elevada estabilidad. (8)

Las propiedades coligativas del agua, tales como el descenso del punto de congelación, la elevación del punto de ebullición, la disminución de la presión de vapor, etc; dependen del número de partículas de un soluto X por unidad de volumen del solvente. (8)

### 1.2.2 Compuestos orgánicos de crecimiento bacteriano.

El desarrollo bacteriano consiste en una sucesión de fases caracterizadas por variaciones en las sustancias nutritivas del medio que se convierten en protonlasma bacteriano, el cual se compone de un conjunto de compuestos complejos. Sin embargo hay ciertos constituyentes químicos que, aunque varían grandemente de un microorganismo a otro, son componentes básicos de todas las células bacterianas.

#### Proteínas.

Las proteínas contienen carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y casi todas contienen azufre. Existen otros elementos adicionales como por ejemplo el fósforo, hierro, cinc y cobre. Los pesos moleculares de las proteínas son muy elevados, pero por hidrólisis ácida, las moléculas protéicas dan una serie de compuestos orgánicos sencillos de bajo peso molecular: estos compuestos son los  $\alpha$ -aminoácidos, que difieren entre si en la estructura de sus grupos R ó cadenas laterales, Fig.2.

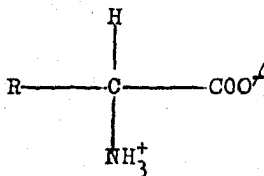


Fig.2, formula estructural general de los  $\alpha$ -aminoácidos hallados en las proteínas. Los grupos R son diferentes.

Por lo común, solamente se encuentran 20  $\alpha$ -aminoácidos distintos en las proteínas.

En las moléculas protéicas los sucesivos restos de aminoá-

cidos se hallan covalentemente unidos entre sí formando largos polímeros no ramificados. Están unidos en una ordenación de \_ cabeza a cola mediante unas uniones amida sustituidas llamadas enlaces peptídicos, producidas por eliminación de los elementos del agua entre el grupo carboxilo de un amino y el grupo  $\alpha$ -amino del siguiente. (8)

Muchos microorganismos requieren uno o más aminoácidos \_ para desarrollarse, estos aminoácidos representan unidades esenciales para el microorganismo que no es capaz de sintetizar los. Las bacterias gram positivas tienen limitada su capacidad para sintetizar los aminoácidos y dependen de una fuente exógena. El requerimiento para un aminoácido determinado está influido con frecuencia por la composición del medio de cultivo. Las interacciones entre los requerimientos de vitaminas y aminoácidos son frecuentes. (8), (9).

Los polipéptidos pueden contener centenares de unidades \_ de aminoácidos. Las cadenas polipeptídicas de las proteínas \_ no son, sin embargo, polímeros al azar de longitud indefinida; cada cadena polipeptídica posee una composición química específica, un peso molecular y una secuencia ordenada de sus aminoácidos estructurales y una forma tridimensional. (6)(7)(8)(9).

Las proteínas se pueden dividir basándose en su composición en: proteínas simples y proteínas conjugadas. Las proteínas simples son aquellas que por hidrólisis producen solamente aminoácidos, sin ningún otro producto principal, orgánico o inorgánico. Las proteínas conjugadas son aquellas que por hidrólisis producen no solamente aminoácidos, sino también otros componentes orgánicos o inorgánicos. La porción no aminoácida de una proteína conjugada se denomina grupo prostético. Las proteínas conjugadas pueden clasificarse de acuerdo con \_ la naturaleza química de sus grupos prostéticos. (8)

En las proteínas existen 4 niveles estructurales. La estructura primaria, consiste en la secuencia de residuos de ami

noácidos. La estructura secundaria, se refiere a la estructura helicoidal o de otro tipo de segmento de la cadena primaria. La adición de pliegues da lugar a una estructura terciaria más o menos globular del monómero (cadena plegada). Finalmente la relación entre diversas proteínas da lugar a una estructura cuaternaria, gracias al ensamblamiento de monómeros idénticos y distintos para formar un oligómero. Las estructuras terciaria y cuaternaria se forma gracias a enlaces de hidrógeno, enlaces hidrofóbicos enlaces iónicos y enlaces de Van der Waals, y pueden ser estabilizadas gracias a la presencia de enlaces covalentes S-S (8),(9).

#### Peptonas.

El término peptona se ha empleado para definir un producto soluble en agua y que es obtenido por hidrólisis de proteínas.

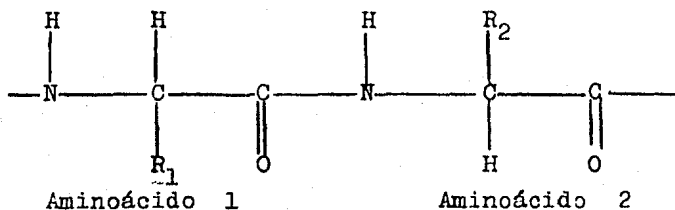
Este material contiene una mezcla de aminoácidos libres, péptidos y proteosas que pueden permanecer en solución después de ser calentadas a 100°C. La presencia de metales alcalinos o fosfatos provoca el precipitado de las peptonas, cuando estas se encuentran en pH neutro. Es por ello que deben emplearse peptonas producidas a pH cercano a la neutralidad. Todas las peptonas deben ser elaboradas bajo condiciones estrictas de control de calidad. Existe una gran variedad de éstas debido a las diferentes demandas de los microorganismos para ciertos aminoácidos y péptidos. En general las proteínas empleadas para la producción de peptonas son de dos tipos, proteínas animales (incluyendo caseína, gelatina y carne) y proteínas vegetales (soya). (8),(10),(11).

Las peptonas se obtienen por diferentes tipos de digestión ya sea ácida, alcalina o enzimática, tabla 2.0 .

La hidrólisis ácida provoca la ruptura de todos los enla

ces peptídicos y produce solamente aminoácidos libres, asimigmo destruye algunos aminoácidos importantes como el triptófano.<sup>(10),(11).</sup>

TABLA 2.0  
Escisión específica de cadenas polipeptídicas:



Metodo.

Tripsina  
Quimotripsina  
Pepsina  
Termolisina  
Bromuro de cianógeno

Enlaces peptídicos, escindidos.

Aminoácido 1 = Lys Arg.  
Aminoácido 1 = Phe, Trp, Tyr.  
Aminoácido 1 = Phe, Trp, Tyr, y otros.  
Aminoácido 2 = Leu, Ile o Val.  
Aminoácido 1 = Met.

Los materiales obtenidos por hidrólisis pueden ser empleados por las bacterias como fuente de energía y elaboración de más proteínas, H<sub>2</sub>S, indol, aminas, etc.<sup>(6),(7),(10),(11).</sup>

En la elaboración de medios de cultivo se recomienda emplear las peptonas que contengan las características apropiadas para la prueba que se desea realizar. Por ejemplo en las pruebas de indol conviene emplear peptonas ricas en triptofano.<sup>(11)</sup>

Es importante considerar que además de los aminoácidos, las peptonas contienen otras sustancias que estimulan el crecimiento de microorganismos tales como los ácidos nucleicos, minerales, vitaminas y en ocasiones carbohidratos como los que se encuentran en las peptonas de soya.<sup>(8),(10),(11).</sup>



### Hidrolizados.

Los hidrolizados son mezclas de péptidos de alto y de bajo peso molecular y de aminoácidos, que se obtienen por hidrólisis ácida, alcalina o enzimática a partir de proteínas.

Los hidrolizados usados en microbiología son:

a) Caseína hidrolizada con ácido. Se obtiene como el hidrolizado de caseína, mediante hidrólisis clorhídrica de caseína, conservándose en este proceso hasta cierto grado, las vitaminas y los factores de crecimiento. Constituye en general, por lo tanto, un buen sustrato para microorganismos y especialmente para la multiplicación de bacilos diftéricos, bacilos tétánicos y estreptococos con la finalidad de obtención de toxoides y vacunas. (11)

b) Caseína hidrólisis (con ácido) exenta de vitaminas. Este hidrolizado se obtiene por hidrólisis clorhídrica de caseína, siendo realizado este proceso de tal manera que resultan notablemente destruidas las vitaminas y los demás factores de crecimiento, en contraste con el punto anterior. Es adecuado para la preparación de medios de cultivo destinados a la determinación microbiológica de vitaminas. Es un polvo coposo, de color amarillo pálido, que se disuelve fácilmente en agua. Su pérdida de peso por desecación, a 105°C, alcanza el 5% máximo, el contenido en cenizas de sulfato alcanza 5% máximo, el contenido de cloruro de sodio es del 25% aproximadamente, el contenido en nitrógeno es de 7% máximo. (11)

c) Caseína hidrolizada (de pancreas) Exenta de antagonistas de sulfamidas. El hidrolizado de caseína se obtiene mediante descomposición enzimática. La hidrólisis da lugar a un elevado contenido en aminoácidos libres. El hidrolizado sirve para la preparación de medios de cultivo para microorganismos exigentes, gracias a su insignificante contenido en antagonistas de sulfamidas (ácido p-aminobenzoico) se utiliza para la preparación de medios de cultivo destinados a ensayos de sensibilidad

( de

gérmenes infecciosos frente a sulfamidas. Es un polvo finamente granuloso, de color amarillo pálido. Su pérdida de peso por desecación, a 105°C, alcanza 7% como máximo, el contenido en cenizas de sulfato alcanza 10%, como máximo, el contenido en nitrógeno es de 12% como mínimo. Carece de carbohidratos fermentables, es fácilmente soluble en agua. En la preparación de medios de cultivo destinados a ensayos de sensibilidad se utiliza en concentraciones de 3.0 g. por litro. (10), (11).

d) Hígado hidrolizado (enzimático). Se obtiene por descomposición enzimática de hígado de buey. Se añade preferentemente a medios de cultivo destinados a la multiplicación de trichomonas, brucellas, mycoplasmas, gérmenes anaerobios y hongos. El hidrolizado se utiliza en concentraciones de hasta 25g por litro. El hidrolizado se utiliza en concentraciones de hasta 10 g. por litro, en el caso de cultivo de trichomonas, siendo el mínimo 5 g. por litro. (10), (11).

#### Extractos.

Los extractos son productos de maceración en solución acuosa obtenidos por calentamiento, que seguidamente se reducen a polvo por evaporación. Son ricos en proteínas de bajo peso molecular y en factores de crecimiento. Los tipos de extracto más utilizados en microbiología son los siguientes:

a) Extracto de carne. Se obtiene a partir de carne libre de tendones y de grasas, que se somete a predigestión enzimáticamente. Mediante investigaciones cromatográficas en capa fina, puede comprobarse que está prácticamente libre de carbohidratos fermentables, resultando especialmente adecuado para la preparación de medios de cultivo destinados a la realización de ensayos de fermentación. Su elevado contenido en albumosas permite un consumo económico, de sólo unos 5 g. por litro.

b) Extracto de levadura. Se obtiene por extracción acuosa de levadura de cerveza autolizada. Debido al elevado conteni-

do en vitamina B, ofrece excelentes condiciones de crecimiento para una serie de microorganismos. Es un polvo fino, amarillo parduzco, de olor característico. Es soluble en agua, dando una solución clara, pardo-amarillenta. La pérdida de peso por desecación, a 105°C, alcanza de un 5% como máximo, el contenido en cenizas de sulfato es de 15% como máximo, el contenido en cloruro de sodio es de 2% como máximo, y el contenido de nitrógeno es del 10% como mínimo. No posee carbohidratos fermentables. Y no se detecta albúmina coagulable. El extracto de levadura se añade a medios de cultivo en concentraciones de 3 g. por litro. (6),(7),(10),(11).

c) Extracto de malta. Se obtiene a partir de cebada malteada. Por su elevado contenido en diversos carbohidratos, sobre todo en maltosa, es adecuado para la preparación de medios de cultivo destinados a la multiplicación de levaduras y mohos. Se utiliza en la preparación de medios de cultivo, en concentraciones desde 1 hasta 10 g. por litro. Su consistencia es de un polvo fino a entrefino, su color es amarillo a parduzco claro, con débil olor a malta. Su contenido en cenizas alcanza 1.3%, el contenido en proteínas es de 5% como máximo.

#### Hidratos de carbono.

Los hidratos de carbono, sácaridos o glúcidos, se definen sencillamente como polihidroxialdehidos o polihidroxiacetonas. Muchos poseen la fórmula empírica  $(CH_2O)_n$ , que da a entender en su origen que se trataba de hidratos de carbono. Estos desempeñan las funciones de almacenamiento de energía y componentes estructurales entre otras funciones.

Los polisacáridos (glucanos) se clasifican químicamente, como homopolisacáridos, que contienen una unidad monosacárida simple que se repite (por ejemplo, el glucógeno, polímero de la glucosa) y heteropolisacáridos, que contienen dos o más unidades monosacáridas que se repiten (por ejemplo, el ácido hialurónico, un polímero en el que alternan el ácido D-glucurónico

y la N-acetil-D-glucosamina). Se clasifican también funcionalmente como polisacáridos de reserva o como estructurales.<sup>(10)(11)</sup>

Las paredes de las células bacterianas contienen péptido glucanos (mureínas), Heteropolisacáridos del ácido N-acetilmu<sup>r</sup>ámico y N-acetilglucosamina, con péptidos cortos que enlazan transversalmente y que contienen D-aminoácidos. Las paredes celulares de las plantas superiores contienen celulosa, otros polisacáridos y proteínas. Las células animales poseen cubiertas flexibles que contienen mucopolisacáridos-ácidos acoplados a las proteínas. Existen tres clases de gluco-proteínas distintas, clasificadas por sus restos aminoácidos a los que se hallan unidos las cadenas laterales de oligosacáridos.<sup>(8)(10)(11)</sup>

### Lípidos.

Los lípidos son biomoléculas orgánicas insolubles en agua que pueden extraerse de las células y los tejidos mediante disolventes no polares, por ejemplo el cloroformo, el éter, o el benceno. Existen diferentes familias o clases de lípidos.<sup>(8)(10)(11)</sup>

Los lípidos desempeñan diversas funciones biológicas importantes, actuando como: a) componentes de membranas, b) cubiertas protectoras sobre la superficie de muchos microorganismos y c) formas de transporte y almacenamiento de energía (los triacilglicéridos desempeñan primordialmente el papel de combustibles de reserva en forma de gotas de grasa en las células).<sup>(10)(11)</sup>

Los lípidos son transportados en la sangre por las lipoproteínas del plasma, de las que existen cuatro clases diferentes, que se distinguen por sus diferentes densidades.

La mayor parte de las membranas contienen entre un 50 y un 60% de proteínas, y un 40-50% de lípidos. Los lípidos están presentes en relaciones molares fijas, que vienen determinadas genéticamente. Se han propuesto varios modelos de estruc

tura de membrana y así podemos observar que la evidencia dada por los experimentos apoya el modelo de mosaico fluido, el cual está constituido por una bicapa de fosfolípidos de cristales líquidos, en la que penetran las proteínas globulares parcial o completamente. Algunas proteínas de la membrana plasmática contienen cadenas laterales oligosacáridas que forman protuberancias en la superficie celular. (8), (10), (11).

#### Vitaminas.

Además de sus componentes mayoritarios, como son los ácidos nucleicos, los glucosidos y los lípidos, las células vivas tienen también sustancias orgánicas que actúan en cantidades mínimas; las vitaminas. Aunque estas sustancias son vitales para muchas formas de vida, su importancia biológica se manifiesta por que algunos organismos no las pueden sintetizar, y deben adquirirlas, de procedencia exógena. (6), (7), (8), (10), (11).

Las vitaminas se clasifican en dos grandes grupos; las hidrosolubles y las liposolubles. La función coenzimática de todas las vitaminas hidrosolubles es razonablemente bien conocida, con excepción de la vitamina C. Se necesitan además otras varias sustancias hidrosolubles como factores de crecimiento para algunos microorganismos, pero se encuentran en cantidades mayores que ellas; se incluye en este grupo el inositol, la colina y la carnitina. (8), (10), (11), (12).

Las vitaminas liposolubles comprenden a las vitaminas A, D, E, y K. Solamente los animales superiores parecen precisar las de procedencia exógena; no se ha podido establecer todavía claramente el papel de las vitaminas liposolubles en los vegetales ni en los microorganismos. No parece que sirvan de componentes de las coenzimas, sino que actúan por otros caminos que precisan solamente cantidades mínimas de ellas. En cultivos celulares se ha podido observar los efectos producidos por las vitaminas A y D. (13)

Aunque estos componentes no bastan por sí solos para proporcionar ritmos normales de crecimiento, cuando la ración se suplementa con alimentos naturales, ricos en factores de crecimiento se observan incrementos en el crecimiento.

1.2.3. Compuestos inorgánicos de crecimiento bacteriano.

Las bacterias necesitan para su desarrollo determinadas sales inorgánicas. Estas desempeñan tres papeles principales;<sup>(9)</sup>

- 1) El mantenimiento de un estado coloidal y una presión osmótica adecuados.
- 2) El mantenimiento del equilibrio ácido básico que aunque menos riguroso que en los mamíferos deben mantenerse.
- 3) La acción como parte de las enzimas o como activadores de las reacciones enzimáticas.<sup>(9)</sup>

Poco se sabe acerca de los requerimientos inorgánicos verdaderos de las bacterias y de su papel en la célula debido a las cantidades mínimas requeridas y por el hecho de que tales vestigios, que se encuentran como impurezas en los componentes normales de los medios de cultivo, suelen satisfacer todas las necesidades de la célula. Entre los elementos inorgánicos esenciales para las bacterias están el azufre, hierro, magnesio y fósforo. El azufre es un constituyente de sustancias tales como cistina, la metionina y la tiamina. Puede ser suministrado a algunos microorganismos en forma de sulfatos; otros requieren una fuente orgánica, como la metionina. El hierro es esencial para el funcionamiento de varias enzimas como se demuestra por la supresión de la actividad de la catalasa, peroxidasa, hidrogenasi fórmica y citocromo en células deficientes de hierro. El coprogen, es un compuesto férrico orgánico aislado de algunas bacterias y hongos, tiene probablemente importancia como sistema transportador de hierro. El magnesio participa en la fosforilación de otras reacciones enzimáticas. Los bacilos esporulados y neumococos forman largas cadenas en un medio deficiente en magnesio; pero vuelven a la normalidad con la adición de éste. Los fosfatos juegan un papel importante en la transferencia de energía; su nivel está ligado al metabolismo; es insignificante en ausencia de materiales nutritivos y marcadamente inhibido por cianuro, dinitro fenol o azida, que reprimen

las actividades metabólicas. La elevación y pérdida de fosfato se altera por los metales pesados según se ha demostrado por (17)(18) medio del estudio realizado por Warig, Wercman y Mitchell.<sup>(14)(15)(16)</sup>

La mayor parte de los estudios sobre los requerimientos inorgánicos de las bacterias se han orientado primordialmente hacia la determinación de los que son estrictamente indispensables.<sup>(7)</sup>

Solamente 22 de los 100 elementos químicos encontrados en la corteza terrestre son componentes esenciales de los organismos vivos, tabla 3.0 . Los cuatro elementos más abundantes en la corteza terrestre son el oxígeno, silicio, aluminio e hierro.<sup>(8)</sup>

TABLA 3.0

Los siguientes elementos son esenciales en la nutrición de una o más especies, pero no todos son esenciales para cada especie.

1)Elementos de la materia organica.

O  
C  
N  
H  
P  
S

2)Rastros de elementos.

Mn  
Fe  
Co  
Cu  
Zn  
B  
Al  
V  
Mo  
I  
Si  
Sn  
Ni  
Cr  
F  
Se

3)Iones monoatómicos.

Na<sup>+</sup>  
K<sup>+</sup>  
Mg<sup>2+</sup>  
Ca<sup>2+</sup>  
Cl<sup>-</sup>



## Oxígeno.

En base de sus requerimientos de oxígeno las bacterias se dividen en cuatro grupos:

- 1) **Aerobios obligados.** Son aquellos microorganismos que requieren oxígeno para su desarrollo. Por ejemplo, los aerobios obtienen energía por la degradación completa de los carbohidratos; Los anaerobios sólo efectúan desdoblamientos o fermentaciones parciales de los carbohidratos. La catalasa y el sistema citocromo que se encuentra en las bacterias aerobias faltan en los organismos anaerobios. (7)
- 2) **Anaerobios obligados.** Son aquellos microorganismos que exigen una tensión reducida de oxígeno para crecer y que no crecen en un medio sólido gelificado con una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub> del aire (18% de oxígeno). Esta explicación o definición no toma en cuenta factores como potenciales de óxido-reducción y la susceptibilidad a los peróxidos, los cuales pueden ser más importantes que la tolerancia al oxígeno. (19), (20).
- 3) **Anaerobios facultativos.** Son aquellos microorganismos por ejemplo que crecen bien, tanto en ausencia como en presencia de aire (enterobacterias).
- 4) **Microaerófilos.** Son aquellos microorganismos que crecen mejor en los medios sólidos, en tensión reducida de oxígeno con 10% de CO<sub>2</sub> del aire. Algunos de estos microorganismos pueden ser capnofílicos más que microaerofílicos. Por ejemplo neisserias patógenas. (19)

El potencial de óxido-reducción (Eh) de los medios de cultivo determina si habrá desarrollo o no de un inóculo cuando se transfiere a un medio fresco. El Eh de la mayoría de los medios en contacto con el aire es de +0.2 a 0.4 voltios a pH= 7.0 . Los microorganismos estrictamente anaerobios son incapaces de desarrollarse a menos que el Eh del medio sea tan bajo como -0.2 voltios. El oxígeno, considerado tóxico para los anaerobios obligados, no es inhibido su crecimiento si el Eh es sufi

cientemente bajo. El Eh de un cultivo disminuye por la exclusión de oxígeno, por el uso de sistemas buffer de óxido-reducción tales como cisteína-cistina o ácido ascórbico y por la actividad de las células en desarrollo. La aereación tiende a producir potenciales más positivos. (2), (7), (9).

El oxígeno se toma principalmente de la atmósfera, y es poco soluble en agua. Los métodos capaces de aumentar la superficie de interfase líquido, gaseosa, son el burbujeo rápido del aire a través de un aspersor poroso o el goteo en reciclado, aumentando de esta forma el crecimiento microbiano. (2), (7).

#### Anaerobiosis.

Los compuestos como tioglicolato de sodio ( $\text{HSCH}_2\text{COONa}$ ), permiten el crecimiento hasta de los anaerobios más estrictos, siendo capaces de crecer en tubos expuestos al aire. En los cultivos mixtos los anaerobios estrictos pueden depender de microorganismos facultativos vecinos, que utilizan el oxígeno y ciertos microorganismos facultativos (por ejemplo E. coli) que necesitan cistina para poder iniciar su crecimiento aerobio en medio de cultivo de tipo mínimo; la cisteína no es útil para ello. Es posible que la anaerobiosis estricta disminuya el número de enlaces S-S necesarios para el crecimiento, y que estos enlaces sean recuperables gracias a la cistina. Las condiciones de anaerobiosis se acompañan de un reducido potencial redox (Eh): (7), (8)

#### Bióxido de carbono.

Las bacterias no se desarrollan cuando se les priva por completo de bióxido de carbono. Esta incapacidad para desarrollarse es debida a una interrupción de procesos de síntesis por lo que el bióxido de carbono es asimilado en la célula. (7), (8). Es difícil valorar con precisión la verdadera importancia de

la asimilación heterotrófica de bióxido de carbono pero hay pruebas convincentes de que es ésta una función fisiológica esencial para todas las formas vivas. (21), (22)

Para obtener una atmósfera que proporcione de 5 a 10 % de  $\text{CO}_2$ , se pone en un recipiente cerrado herméticamente una bujía para que se consuma el  $\text{O}_2$  y se apaga al concluir la combustión. (7), (8)

Las células fotosintéticas y la células heterótrofas aerobias se alimentan en una relación llamada sintropía, en los ciclos de carbono y del oxígeno. Las células fotosintéticas producen compuestos orgánicos, tales como la glucosa, a partir de  $\text{CO}_2$  atmosférico y del agua y a expensas de la energía solar. Las células heterotróficas utilizan compuestos orgánicos producidos por las células fotosintéticas como combustibles y el bióxido de carbono formado como producto final de su metabolismo vuelve a la atmósfera para ser utilizado de nuevo por las células fotosintéticas; fig. 3.0. (7), (8)

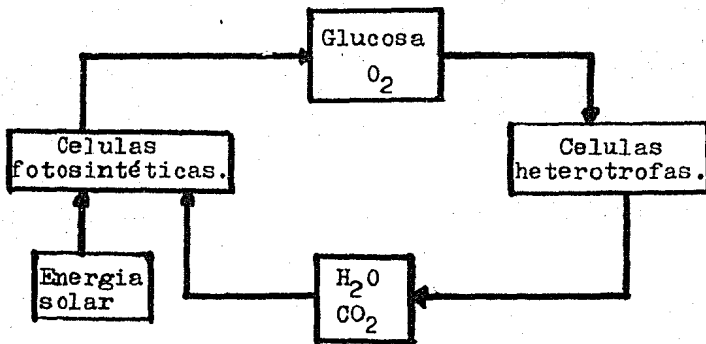


Fig. 3.0, ciclos del carbono y del oxígeno en la biosfera.

Nitrógeno.

En el ciclo biológico del nitrógeno, las plantas obtienen su nitrógeno en forma de nitrato reduciéndolo a amoníaco y aminoácidos, estos últimos son utilizados después por los animales y devueltos al suelo en forma de urea o de amoníaco, los cuales son reoxidados a nitratos por bacterias del suelo (solamente las bacterias, fijadoras de nitrógeno pueden emplear el nitrógeno molecular de la atmósfera, fig. 4.0. (6), (7), (8))

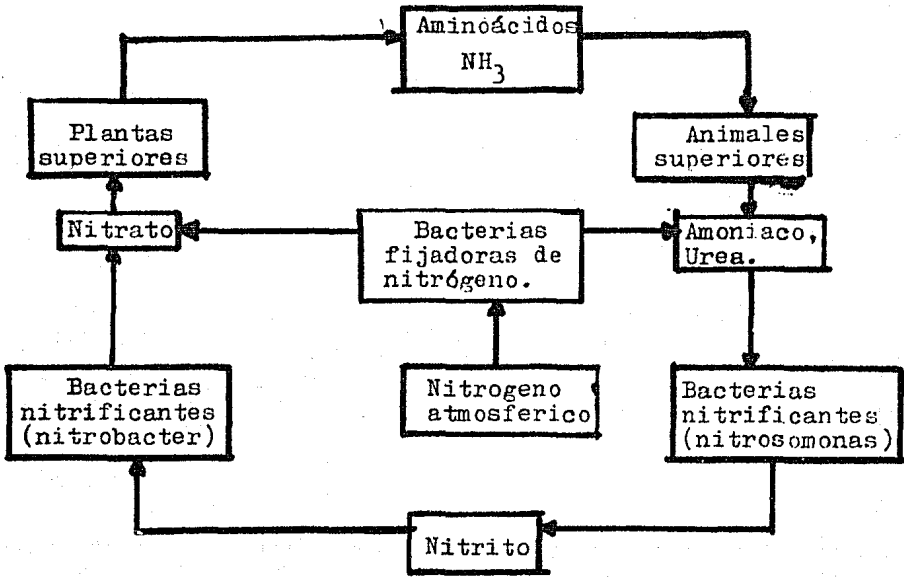


Fig. 4.0, Ciclo del nitrógeno.

### Oligoelementos.

El  $\text{Fe}^{3+}$ , es fundamental para formar proteínas que contienen grupos hemo en los organismos aerobios, y necesarios para formar enzimas que no poseen grupos hem en los anaerobios (por la toxina diftérica). Otros elementos necesarios son el  $\text{Zn}^{2+}$ , el  $\text{Mn}^{2+}$ , y el  $\text{Mo}^{2+}$ , este último es utilizado para la fijación de  $\text{N}_2$  y para la reducción de nitratos. El  $\text{Co}^{2+}$  es utilizado por las bacterias que producen vitamina  $\text{B}_{12}$ . El  $\text{Co}^{2+}$  no ha sido encontrado en ninguna enzima, y se ha demostrado su poder de inhibición de crecimiento microbiológico. Referente al  $\text{Ca}^{2+}$ , los microorganismos gram negativos no precisan de  $\text{Ca}^{2+}$ , en cambio el  $\text{Ca}^{2+}$ , es un componente importante de la pared de los bacilos gram positivos y de sus esporas, y al parecer interviene también en los procesos de excreción de proteasas en dichos bacilos. (7)

### Siderocromos.

Siderocromos y transporte de Fe. A pH neutro el  $\text{Fe}^{3+}$  forma hidróxidos coloidales insolubles. Por esta razón la célula ha de producir y de excretar compuestos quelantes de  $\text{Fe}^{3+}$  (es decir, compuestos que forman complejos coordinados solubles), facilitando así su absorción. La producción de estos compuestos dependen de su bajo contenido en Fe, hay dos tipos de compuestos capaces de unirse al  $\text{Fe}^{3+}$ , (siderocromos) los ácidos hidroxámicos ( $-\text{CONH}_2\text{OH}$ ), también llamados sideroaminas y los catecoles (2,3, hidroxibencenos). El citrato es también un quelante de  $\text{Fe}^{3+}$ . (7)

Las bacterias entericas, forman un trímero cíclico a partir de la 2,3, dihidroxibenzalserina, llamado enterobactina o enteroquelina, mientras que Enterobacter (o aerobacter) produce también ácido hidroxámico (aerobactina). Una especie de *Mico bacterium* precisa para crecer de una sideramina, llamada mico

bactina, producida por otras micobacterias. Ciertos microorganismos producen sideromicinas que son análogos de los antibióticos, no quelantes, que impiden la captación de sideraminas. (7)

#### 1.2.4 Temperatura.

El calor es una de las formas de energía que posee la materia en virtud del movimiento de sus moléculas. El cuadrado de la velocidad media de las moléculas es proporcional a la temperatura. La temperatura es, pues una medida de la intensidad de calor en un cuerpo y la cantidad de calor o energía en el cuerpo es el producto de temperatura por masa o volumen y también por una constante característica llamada calor específico. Frío es un término que significa simplemente temperaturas más bajas que alguna de referencia, que suele ser igual o más baja que la temperatura del cuerpo animal, tal como la temperatura ambiente. De todos los agentes físicos, el calor tiene las mayores aplicaciones generales y las más importantes consecuencias para el estudio y cultivo de las bacterias y para la destrucción de éstas en su empleo para la esterilización. (23)

La temperatura influye en la velocidad de las reacciones químicas; en general, éstas proceden con mayor rapidez a temperaturas altas, cuando las moléculas se mueven más aprisa. Esta influencia se mide por el coeficiente de temperatura de una reacción a  $T^{\circ}\text{C}$ . Y la misma reacción a  $(T+10)^{\circ}\text{C}$ . Este coeficiente es la relación de las constantes de velocidad y se expresa por  $Q_{10}$  y establece el número de veces que con mayor rapidez o lentitud procede una reacción al cambiar la temperatura. Para las reacciones químicas en general es mayor de dos, mientras que para la mayor parte de los procesos físicos se aproxima a la unidad. En los procesos químicos vemos que las velocidades de reacción tienden a elevarse en proporción geométrica (aumentando un factor  $Q_{10}$  por cada diez grados) más bien que en línea recta. En el estudio del metabolismo bacteriano, en el ensayo de desinfectantes y en los estudios bacteriológicos en general, es importante recordar que un aumento de  $10^{\circ}\text{C}$ , en la temperatura, entre los límites de 18 a  $37^{\circ}\text{C}$ , suelen duplicar por lo menos la velocidad de las reacciones. La ordenación del número de muertes por el calor sigue en escala logarítmica; el

cociente por el cual se reduce la población viable permanece constante en el tiempo. Los cocientes de mortalidad son, por eso, una medida mejor del poder bactericida que los datos de tiempo y (o) temperatura como base para establecer un punto final de esterilización. (9)

Si bien es costumbre hablar de una temperatura óptima para el desarrollo bacteriano, en un análisis final es necesario definir la fase o clase de actividad bacteriana a la cual se aplica el término. Las bacterias pueden permanecer en estado de reposo sin evolucionar o pueden morir a determinadas temperaturas bajas. El aumento de temperatura por encima de un punto determinado inhibe sus actividades y acaba matándolas. La actividad bacteriana entre estos límites extremos es muy variada. La temperatura óptima para la multiplicación rápida no es siempre la de mayor cosecha, debido a que los productos tóxicos de desecho se acumulan con más rapidez a esta temperatura y el catabolismo endógeno de la fase de mortalidad tiene, asimismo, un coeficiente de temperatura mayor que el del metabolismo anabólico del desarrollo. Las temperaturas óptimas de los procesos fermentativos, proteolíticos y sintéticos no son siempre las mismas que las del desarrollo y también difieren entre ellas. La formación de esporas y flagelos tiene, en algunos casos, temperaturas óptimas diferentes de la formación de toxinas y de virulencia.

Aunque existen bacterias que se desarrollan a temperaturas tan bajas como 0°C, y tan altas como 85°C, las formas vegetativas de casi todas las bacterias patógenas se desarrollan entre 20°C y 40°C. Algunas son relativamente insensibles a los cambios de temperatura, mientras que otras como el gonococo, neumococo y bacilo tuberculoso, son bastante susceptibles y se desarrollan sólo dentro de límites que difieren en pocos grados de su punto óptimo. Los bacilos del grupo coli, Bacillus anthracis, Vibrio comma y otros crecen a temperaturas tan bajas como la de 10°C. y tan altas como de 40°C. o más. Los límites



de temperatura entre los cuales se desarrollan las bacterias saprófitas son aún mucho más amplios. (9)

Efectos letales y destrucción por calor. Las bacterias pueden morir por exposición a temperaturas bajas y altas. Se emplean temperaturas letales para obtener productos bacterianos y deshacerse de materiales de bacterias vivas esterilizándolos con calor. Estos efectos de la temperatura están influenciados por otras condiciones tales como pH del medio y en caso de estar los microorganismos relativamente secos, por la cantidad de agua residual. En medios húmedos, las bacterias son más sensibles al calor si la reacción es ácida que se es alcalina. Para materiales secos la aplicación de calor húmedo es más eficaz que la del calor seco, tabla 4.0. (23), (24)

La resistencia a temperaturas extremas depende de la especie de bacteria, etapa de desarrollo y si forma o no endosporas resistentes. La gran resistencia térmica de estas últimas se ha atribuido al estado de deshidratación y concentración del protoplasma dentro de ellas.

TABLA 4.0

Tiempos de esterilización por calor seco. (24)

Temperatura(°C):	Tiempo (horas)
140	3
150	2
160-170	1
180	20-30, minutos.
185	5- 10, minutos.

El límite más bajo de temperatura para el crecimiento bacteriano puede estar en relación con un fenómeno de solidificación de los lípidos de membrana o con la extrema sensibilidad de los procesos de iniciación de la síntesis proteica frente a temperaturas bajas, por encima de las temperaturas máximas,

muchas enzimas se desnaturalizan y se produce la muerte celular.<sup>(7),(9)</sup>

Los límites térmicos para el crecimiento de un microorganismo son una característica estable de gran valor taxonómico. En general, las bacterias se clasifican en :

- 1) Mesófilas.
- 2) Psicrófilas (ó criófilas)-Psicrotróficas.<sup>(25)</sup>
- 3) Termófilas-Termodúricas.<sup>(25)</sup>

#### Temperaturas bajas.

Las temperaturas bajas son mucho menos destructivas que las altas. En la mayoría de los casos, temperaturas de 5 a 10°C. son útiles para conservar las bacterias vivas durante largos periodos, los procesos metabólicos se inhiben en gran medida y la vida se mantiene en un estado de reposo. Rara vez se utilizan temperaturas bajas para la esterilización. Si bien algunas especies, como gonococos y meningococos, mueren rápidamente a 0°C, los bacilos de la difteria, tifoidea y otros se han enfriado a la temperatura del aire líquido y del hidrógeno líquido (-250°C) sin esterilización. La congelación de las bacterias en agua es más eficaz que la aplicación de frío seco, pero no es un medio seguro de inactivarlas, por lo cual no se impide la diseminación de la fiebre tifoidea por medio del hielo contaminado. Las congelaciones y descongelaciones repetidas matan muchos más organismos que una sola congelación.<sup>(26)</sup>

Los microorganismos Psicrotróficos son aquellos capaces de crecer a 5°C o temperaturas inferiores, sin tener presente su temperatura optima de crecimiento. El termino Psicrófilo hace referencia a la temperatura optima de crecimiento sin tener en cuenta su temperatura mínima de crecimiento. Los microorganismos termofílicos son aquellos que no solo resisten el tratamiento térmico a temperaturas relativamente altas, si no que las necesitan para su crecimiento y actividades metabólicas.

Los microorganismos termodúricos. son aquellos que resisten el tratamiento térmico a temperaturas relativamente altas, pero no crecen necesariamente a estas temperaturas. (25)

### Esterilización por calor.

El calor es el agente físico que tiene aplicación más amplia y eficaz para la esterilización. Se puede aplicar humedo o seco, dependiendo la elección de la naturaleza de los materiales a esterilizar. Los dos métodos muestran, además bastantes diferencias en su eficacia a la temperatura dada. El reconocimiento de este hecho se debe en gran parte a las pri-  
meras investigaciones de Koch. (6),(9)

Estas observaciones demostraron que las esporas del car-  
bunco se destruyeron por ebullición en agua (100°C) de uno a do-  
ce minutos, mientras que el aire seco sólo era eficaz a 140°C  
durante tres horas. Esta diferencia ha sido repetidamente con-  
firmada por muchos otros investigadores. (6),(7),(9)

El calor seco destruye las bacterias por oxidación; la  
acción del calor húmedo es más rápida y completamente distin-  
ta, ya que es por coagulación de las proteínas. Las bacterias  
expuestas al calor húmedo o al vapor, absorben agua y se hacen  
coagulables. También absorben, en el caso del vapor, el calor  
del agua de condensación (537 calorías por mole). Esta es otra  
ventaja del vapor y además la humedad hace que materiales como  
apósitos y paños quirúrgicos e instrumentos de madera, sean me-  
jores conductores del calor y aumente mucho el poder de penetra-  
ción del calor húmedo. (6),(9)

El calor húmedo puede ser aplicado por ebullición del agua  
(100°C), vapor fluente a la presión atmosférica (100°C) o como  
vapor a presión, cuya temperatura y eficacia como agente este-  
rilizante aumenta con la presión. Las esporas de algunas bac-  
terias del suelo que permanecen viables después de varias horas

en el vapor fluente, mueren en pocos minutos bajo la presión a 120-140°C. Es importante que el vapor esté saturado; es decir, que tenga toda el agua que la temperatura permite. El vapor no saturado o el llamado supercalentado es menos eficaz, posiblemente por su relativa sequedad. Se ha dicho que por encima de 125°C. el vapor supercalentado es sobrepasado en poder esterilizante por el vapor fluente a 100°C. (6), (9)

La ordenación de las muertes da una curva logarítmica tanto para el calor seco como para el húmedo, sólo la velocidad es diferente.

#### Métodos prácticos de esterilización.

**Combustión.** Para objetos que han de ser destruidos o que resisten la incandescencia, el fuego directo es un método seguro y fácil de esterilización. Aguja bacteriológica, laminas de vidrio y otros pequeños objetos usados para manejar las bacterias se acostumbra flamearlas pasándolas por la llama de un mechero bunsen o de alcohol.

**Aire caliente.** La esterilización se lleva a cabo en cámaras de aire caliente de diseño sencillo y distinta forma que consiste, por lo regular, en una caja metálica de doble pared, recubierta de material aislante para conservar el calor; el calentamiento se hace por aire circulante calentado por mecheros de gas o por irradiación de resistencias eléctricas colocadas entre las dos paredes. Van provistas de un termómetro en la parte superior y de un dispositivo automático para regular la temperatura. Para asegurar la esterilización de los objetos en una de estas cámaras, la temperatura debe mantenerse entre 150 y 160°C. durante una hora. Los paños de algodón se tuestan a 200°C. la esterilización por el calor seco suele utilizarse en el laboratorio para cajas de petri, matraces, tubos de ensayo, jeringas y pipetas y también para muchos artículos que se estropean por la humedad, tabla 4.0. (6), (7), (9)

Calor húmedo. Diversos instrumentos jeringas y otros objetos adecuados se pueden esterilizar por ebullición en agua. Bastan cinco minutos para matar las formas vegetativas de todas las bacterias; las esporas requieren, en general, una o dos horas, si bien hay esporas de algunas bacterias saprófitas del suelo que han resistido dieciseis horas de ebullición. La adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en una concentración de 1% al agua en ebullición acelera la destrucción de las esporas y evita la herrumbre en los objetos de metal esterilizados de este modo. La adición de ácido fócnico, en proporción de 2 al 5%, al agua hirviente, asegura la destrucción de esporas del carbunco en diez a quince minutos. (9)

Pasteurización. Algunos alimentos, en especial la leche, se dejan libres de bacterias patógenas por este procedimiento, que supone el calentamiento hasta unos  $60^\circ\text{C}$ , durante treinta minutos y enfriamiento rápido a  $13^\circ\text{C}$ , o menos.

Vapor fluente. El vapor fluente se usa comúnmente como método de esterilización por el calor. Se puede llevar a cabo en una simple vasija de las usadas en la cocina. En los laboratorios, el aparato original de vapor ideado por Koch ha sido reemplazado por otros construidos con el sistema de esterilizador de Arnold. En éstos, el vapor se genera por ebullición de una pequeña cantidad de agua y circula por la cámara del esterilizador; el agua de condensación vuelve a rellenar el agua original, en donde sigue en circulación. La exposición al vapor en uno de estos aparatos asegura la muerte de las formas vegetativas de las bacterias en quince a treinta minutos.

Esterilización fraccionada. Se emplea para la esterilización, a  $100^\circ\text{C}$ , de medios de cultivo. Consiste en la exposición repetida de los medios a  $100^\circ\text{C}$ . Durante tres días consecutivos, quince a treinta minutos diarios. En los períodos intermedios de incubación las esporas viables se desarrollan en formas vegetativas que son destruidas en el siguiente período de calentamiento a  $100^\circ\text{C}$ . Tres de estos ciclos aseguran la esterilidad.

Se debe recordar que este método es aplicable solo a medios favorables al desarrollo bacteriano en los que fácilmente las esporas se desarrollan en forma vegetativas. (6),(7),(9)

Excepcionalmente, el método puede fracasar aun en medios favorables, cuando hay bacterias anaerobias esporuladas. Se ha observado que durante los intervalos de esterilización fraccionada se desarrollan esporas anaerobias después de la siembra de los medios con otras bacterias cuando la simbiosis hizo posible su desarrollo. Con este método se han encontrado bacilos del tétanos en cultivos, de bacilos diftéricos empleados para la producción de toxina. Además, esporas que han sido levemente dañadas por el calor pueden necesitar para su germinación un tiempo más largo del usual. (9)

Vapor a presión. El uso del vapor a presión es el método de esterilización más poderoso que se conoce. Se aplica a la esterilización de objetos, ropa y de todas aquellas cosas que por su tamaño puedan ponerse en el aparato y que no se dañen con la humedad. En el laboratorio se emplea para la esterilización del instrumental infectado, tal como matraces, tubos de ensayo y cajas de petri que contienen cultivos. El aparato empleado recibe el nombre de autoclave, de éstos hay muchas clases y son fijos o portátiles. Consisten fundamentalmente en una cámara metálica de paredes resistentes, con una tapa o puerta que se asegura para resistir la presión interna de vapor. Van provistos de manómetro y válvula de seguridad. En los más sencillos, el agua se coloca en el fondo de la cámara, donde hierve por aplicación directa de llama de gas, hasta que el aire es reemplazado por vapor; entonces se cierra la válvula y se continúa la aplicación de calor hasta alcanzar la presión deseada. En los modelos fijos más complicados el vapor se suministra por tubos de calentamiento. Cualquiera que sea el modelo, es necesario desplazar todo el aire de la autoclave antes de cerrar la válvula, ya que de otra forma la aplicación de calor entre húmedo y seco redundaría en pérdida de eficacia.

Cuando se ha completado la esterilización se disminuye poco a poco la presión, porque si ésta baja rápidamente por abrir antes de tiempo la salida del vapor se produce la ebullición súbita de los líquidos contenidos en los frascos y matraces, con la consiguiente expulsión de los tapones. (6)

La exposición al vapor en autoclave a quince libras de presión (sobre la presión atmosférica) durante quince a veinte minutos es suficiente para destruir todas las formas de vida bacteriana incluso esporas, tabla 5.0. (6), (7), (9).

TABLA 5.0  
Temperaturas de vapor en el autoclave a varias presiones.

Presiones lb/in <sup>2</sup>	Temperatura °C	Presiones lb/in <sup>2</sup>	Temperatura °C
0	100.00	16	122.00
1	101.90	17	123.00
2	103.60	18	124.10
3	105.30	19	125.00
4	106.90	20	126.00
5	108.40	21	126.90
6	109.80	22	127.80
7	111.30	23	128.70
8	112.60	24	129.60
9	113.90	25	130.40
10	115.20	26	131.30
11	116.20	27	132.10
12	117.60	28	132.90
13	118.80	29	133.70
14	119.90	30	134.50
15	121.00		

La presencia de cualquier volumen de aire en el autoclave, invalida las lecturas de temperatura del cuadro.

### Desecación.

Por el proceso natural de desecación en el aire las formas vegetativas de la mayor parte de las bacterias patógenas mueren en pocas horas. Aun en bacilo tuberculoso, que es algo más resistentes que otras bacterias, muere por desecación en el aire en algunos días. La limpieza de paredes y pisos y la desecación natural ha reemplazado ampliamente los procedimientos más antiguos, costosos e ineficaces de fumigación en la desinfección de las casas, ocupadas previamente por pacientes con enfermedades transmisibles. (9)

Las endosporas que sobreviven durante mucho tiempo en el aire, suelo y objetos secos, son más resistentes a la desecación.

En general, se puede decir que las bacterias sometidas a desecación se reducen mucho en número, pero se ha observado tan bien que las sobrevivientes a la desecación inicial, si se ejecuta adecuadamente permanecen viables por períodos muy largos, por lo que la desecación, considerada en general como destructiva para las bacterias, es una manera útil de conservar cultivos bacterianos a salvo de mutaciones o producción de variantes. (9)

Para lograr este resultado la desecación debe ser rápida y en estado de congelación. Flosdorf y Mudd han demostrado que las bacterias congeladas y desecadas en su aparato de "liofilización" conservan la virulencia y sus características generales. (9)



### 1.2.5 pH

Los pequeños números que representan las bajas concentraciones que de iones hidrógeno e hidroxilo existen en el agua son poco cómodos de escribir y de expresar. En 1909, Sørensen introdujo el término pH, definido en relación a la concentración del ion hidrógeno, cuya expresión simplifica notablemente. El pH se define como sigue:

$$\text{pH} = \log (1/ [\text{H}^+]) = -\log \text{H}$$

La forma de expresar la concentración de ion hidrógeno mediante el pH se ha generalizado para expresar cantidades muy pequeñas. Por ejemplo,  $\text{pOH} = -\log \text{OH}^-$  ;  $\text{pK}_{\text{H}_2\text{O}} = -\log K_{\text{H}_2\text{O}}$  ;  $\text{pK}_a = -\log K_a$ ;  $\text{pK}_s = -\log K_s$ . (27)

La mayoría de los microorganismos toleran cambios de pH de hasta 3 y 4 unidades, pero todo cambio superior a una unidad afecta al crecimiento. (7), (8), (9)

El nivel más bajo de pH tolerado depende de la concentración de ácidos orgánicos presentes en el medio. Cuando más bajo sea el pH, mayor será la proporción en que un ácido presenta su forma disociada. (8)

La concentración de hidrogeniones ejerce su influencia sobre la acción de los desinfectantes por afectar a éstos y a las bacterias. Cuando están suspendidas en un medio de  $\text{pH} = 7.0$  las bacterias tienen carga negativa, un aumento del pH resultará en un aumento de la carga y puede alterar la concentración efectiva del agente químico en la superficie de la célula. También el pH determinará el grado de ionización del desinfectante, en general, las formas no disociables pasan por las membranas celulares más fácilmente que las relativamente inactivas formas iónicas. (7), (9), (12)

El funcionamiento correcto de una célula bacteriana requiere el mantenimiento de su proteína citoplásmica en un estado coloidal organizado. Los agentes que desorganizan esta situación, por coagulación o precipitación, reducen la actividad potencial de las enzimas, ya que las reacciones enzimáticas ocurren en sitios específicos de la enzima. Cuando estos agentes reaccionan en concentraciones tóxicas con las nucleoproteínas, la muerte es inevitable. Los ácidos, álcalis, alcohol, acetona y otros solventes orgánicos se encuentran entre los agentes químicos que actúan primariamente desnaturando las proteínas activas. (12)

El pH influye sobre la velocidad de incorporación de los solutos a la célula bacteriana, ya que los iones  $H^+$  y  $OH^-$  tienen libre acceso a la superficie exterior de la membrana. Se ha verificado pocos estudios sobre el efecto del pH sobre la acción de los distintos procesos de transporte de solutos. No obstante, se ha demostrado que el pH puede afectar a la capacidad de las proteínas de transporte de *Sacharomyces cerevisiae* para distinguir entre  $K^+$  y  $Na^+$ ; cuando el pH es bajo, se incorpora preferentemente el  $K^+$ . (12)

Los ácidos y álcalis pueden ejercer su actividad desinfectante por sus iones libres  $H^+$  y  $OH^-$  por la molécula disociada y por alterar el pH del medio en que se encuentra el microorganismo. Los ácidos minerales fuertes y álcalis fuertes tienen un poder desinfectante proporcional a su grado de disociación en las soluciones. Algunos hidróxidos, como el hidróxido de bario, son más eficaces de lo que se esperaría por su grado de disociación, indicando que el catión metálico ejerce acción tóxica directa sobre las bacterias. El ácido bórico en solución 1% o al 2% se disocia muy poco y es un antiséptico muy débil, pero no es irritante y por eso resulta muy útil para la limpieza mecánica de los ojos y otros tejidos delicados. (6), (7), (9)

La actividad de los ácidos orgánicos es, al parecer, debi

do a su molécula intacta, puesto que se disocia menos en solución que los ácidos minerales; pero algunos son más activos como desinfectantes. El ácido benzoico es unas siete veces más eficaz que el ácido clorhídrico, demostrando esto que la molécula completa o el radical orgánico tiene poder desinfectante. El acumulo del ácido láctico y otros ácidos orgánicos durante el desarrollo y metabolismo bacteriano retrasan y finalmente detienen el desarrollo en muchas especies de bacterias. Los ácidos etil metil parahidroxibenzoico son más fungicidas que bactericidas. El ácido para aminobenzoico se ha empleado con éxito en el tratamiento de las enfermedades por Rickettsias y el ácido para aminosalicílico en el de la tuberculosis. Los propionatos, se han empleado los propionatos sódico y calcico han resultado útiles como preservadores de alimentos. (7), (9)

### 1.2.6 Curvas de crecimiento.

Desde el punto de vista de los estudios bioquímicos, el crecimiento bacteriano acostumbra definirse en términos de materia celular, mientras que en estudios genéticos o infecciosos se habla más de número de células, ambos conceptos son proporcionales en condiciones de crecimiento continuo, pero esta <sup>(7)</sup> relación puede variar si lo hacen las condiciones de crecimiento.

La masa celular puede determinarse directamente en términos de peso seco, o indirectamente en términos de volumen total celular o contenido de nitrógeno. Asimismo, el índice más útil es el de la turbidez, la cual en un fotocolorímetro o en un espectrofotómetro permite que se siga la densidad del cultivo a medida que éste crece. La absorción de la luz por los constituyentes celulares coloreados es insignificante a longitudes de onda entre los límites visibles. La mayor parte de la turbidez es debida a la dispersión de la luz que depende del elevado índice de refracción de las bacterias (alrededor de 25% del sólido, contra el 1 al 2 % del medio).

En general se emplean longitudes de onda situadas entre 490 y 550 nm: cuanto más baja la longitud de onda, más alta es la dispersión de la luz, aunque por abajo de 490 nm, la absorción por productos amarillentos debido al tratamiento por el autoclave puede ser importante. La turbidez es lineal con una densidad bacteriana entre 0.01 mg de peso seco por ml (una  $10^7$  células por ml.) y 0.5 mg por ml. La adición de una pequeña cantidad de sal o de azúcar determinará una apreciable contracción en la bacteria. Y aunque en este caso decrezca la sección transversa, aumentará el índice de refracción, con lo cual se produce un incremento en la dispersión de la luz. <sup>(7)</sup>

El crecimiento bacteriano, si el medio es adecuado, es típicamente del tipo exponencial. Sin embargo, los cultivos que

crecen en forma exponencial acaban frenando su crecimiento, que finalmente cesa del todo, ya sea debido a que una de las sustancias nutritivas indispensables se agota, o por la presencia de una acumulación de sustancias inhibitoras (frecuentemente ácidos orgánicos o alcohol). En este paso de una fase logarítmica a una fase estacionaria, las células disminuyen su tamaño, ya que se dividen mucho más rápidamente de lo que crecen, además, se producen cambios importantes en su composición macromolecular, por lo que pueden llegar a perder parte de su contenido intracelular en  $K^+$ , fig. 5.0 .(7)

Si las células que se encuentran en una fase estacionaria son trasladadas a un recipiente conteniendo medio recién preparado, aparece una fase de adaptación cuya duración depende del propio microorganismo, y también del medio utilizado, esta fase es de mucho mayor duración si se emplea un medio mínimo que - si se emplea un medio rico en nutrientes. La adaptación afecta más al número de células que a su masa ya que las células de la fase estacionaria aumentan su tamaño antes de empezar a dividirse, fig. 5.0 .(2),(7)

Si las células que crecen de forma exponencial en un medio rico en nutrientes son trasladadas a un medio idéntico recién preparado, la fase de adaptación no aparece. El traslado de un medio mínimo a un medio rico puede dar lugar o no a una fase de adaptación, es más probable que dicha fase aparezca si se emplean inóculos pobres (por ejemplo por debajo del nivel de turbidez visible). Uno de los factores que favorecen la aparición de una fase de adaptación es la inhibición del crecimiento por acción de contaminantes del medio (por ejemplo jabón o iones metálicos pesados). Otro factor considerado es la necesidad de acumular el  $CO_2$  necesario para los procesos de biosíntesis. (7),(9)

Las células que se encuentran en una fase estacionaria de crecimiento presentan cambios químicos de tipo adaptativo que aumentan su estabilidad. Sin embargo, si la incubación continúa las células mueren y las consiguientes alteraciones de

membrana activan las enzimas autolíticas. Los productos liberados por los procesos de autólisis observan un crecimiento críptico, que mantiene a una poca células supervivientes; de ahí que los mutantes más resistentes se acumulen a pesar de que no exista un verdadero crecimiento.

Crecimiento exponencial.

El grado de síntesis de las sustancia bacterianas en la fase exponencial de crecimiento es proporcional en todo momento a la cantidad presente en dicho momento.

$$\partial B / \partial t = \alpha B \dots\dots\dots(1)$$

Donde B es la masa bacteriana, t es el tiempo y  $\alpha$  la constante de crecimiento instantaneo para el cultivo (el incremento relativo por unidad de tiempo), de aquí:

$$\partial B / B = \alpha dt, \text{ (ó } \partial \ln B = \alpha t) \dots(2)$$

Integrando:

$$\int_{B_0}^{B_t} \frac{\partial B}{B} = \int_0^t \alpha dt, \text{ y } \dots\dots\dots(3)$$

$$\ln B_t / B_0 = \alpha t, \text{ ó } \ln B_t = \ln B_0 + \alpha t \dots\dots\dots(4)$$

De aquí que en esta fase la gráfica de logaritmo de B en relación con el tiempo de una línea recta. Esta gráfica semi-logarítmica se usa generalmente para las curvas de crecimiento bacteriano. La masa bacteriana aumenta exponencialmente con el tiempo, lo que significa que el logaritmo de la masa aumenta linealmente con el tiempo, por lo cual este tipo de crecimiento se denomina exponencial o fase logarítmica, fig. 5.0 .

Ocasionalmente es necesario convertirla constante del

grado de crecimiento instantáneo  $\alpha$ , que expresa sus unidades de tiempo<sup>-1</sup>, en unidades de tiempo más habituales  $T = 1/\alpha$ . Este tiempo de generación instantáneo  $T$  representa el tiempo que sería necesario para duplicar la masa en caso de que el grado de crecimiento  $\alpha$  de  $B_0$  del tiempo cero no cambiara. No obstante, el valor de  $B$ , y por lo tanto de  $\alpha B$ , en el crecimiento exponencial crece constantemente, y al final de una duplicación el grado de síntesis celular es dos veces lo que fue en su comienzo. De aquí que en el cultivo que crece exponencialmente, el tiempo de duplicación real,  $t_D$ , es más corto que  $T$ , fig. 6.0. La relación entre los dos es variable mediante la colocación de  $B_t$  a  $2B_0$  (es decir, una duplicación en la ecuación (4)). (7), (9).

$$\ln B_t / B_0 = \ln 2 = \alpha t_D$$

$$t_D = (1/\alpha) \ln 2 = 0.69 (1/\alpha) = 0.69 T$$

$$T = 1.45 t_D$$

El tiempo que tarda el cultivo en duplicarse recibe el nombre de tiempo medio de generación o TMG. En general, el grado de crecimiento se expresa en términos de  $t_D$  o de su recíproco  $\mu (= 1 / t_D)$ , que es la constante de crecimiento exponencial, expresado en generaciones por hora. (7)

Estas relaciones se dan gráficamente en la fig. 6.0, la cual muestra también la curva de crecimiento exponencial cuando se presenta linealmente y no en forma logarítmica en relación con el tiempo. Podría obtenerse la misma curva si en vez de medir el número de células en ningún momento son distribuidas al azar en relación con la fase del ciclo de división: de aquí que la velocidad de aparición de células nuevas en el crecimiento de un hipotético cultivo sincronizado en forma perfecta se describe en la fig. 7.0.

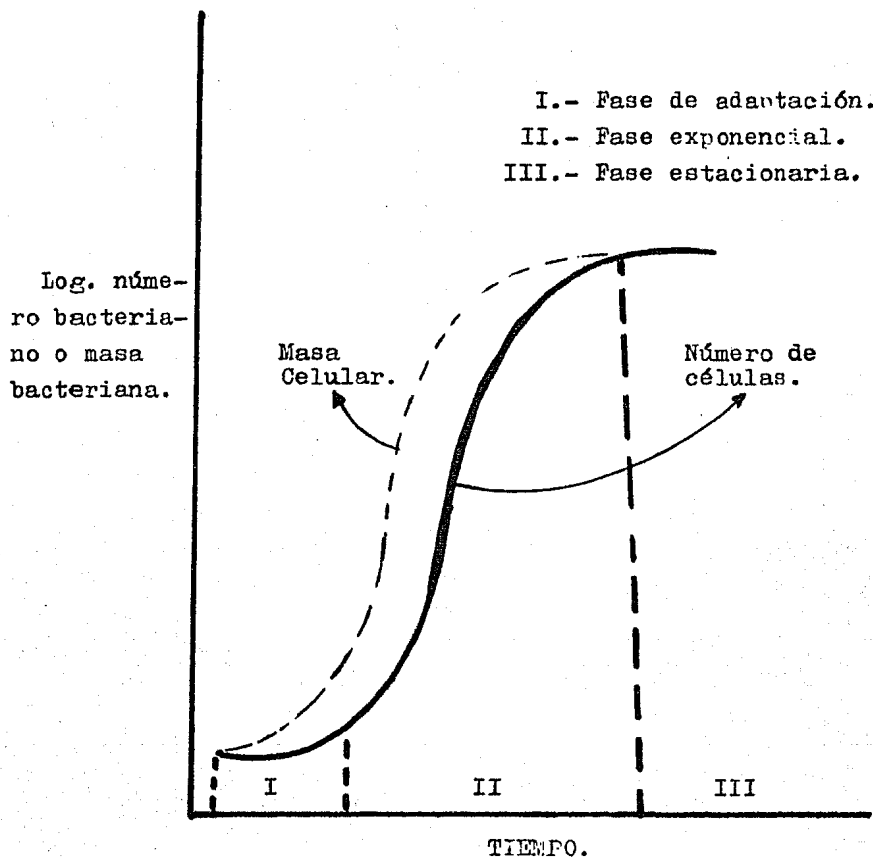


Fig. 5.- Fases del crecimiento bacteriano que se inician con un inóculo de células en fase estacionaria. Obsérvese que las fases clásicas definidas en términos del número de células no coinciden en forma precisa con las fases de crecimiento expresado en términos de masa protonoplásmica.



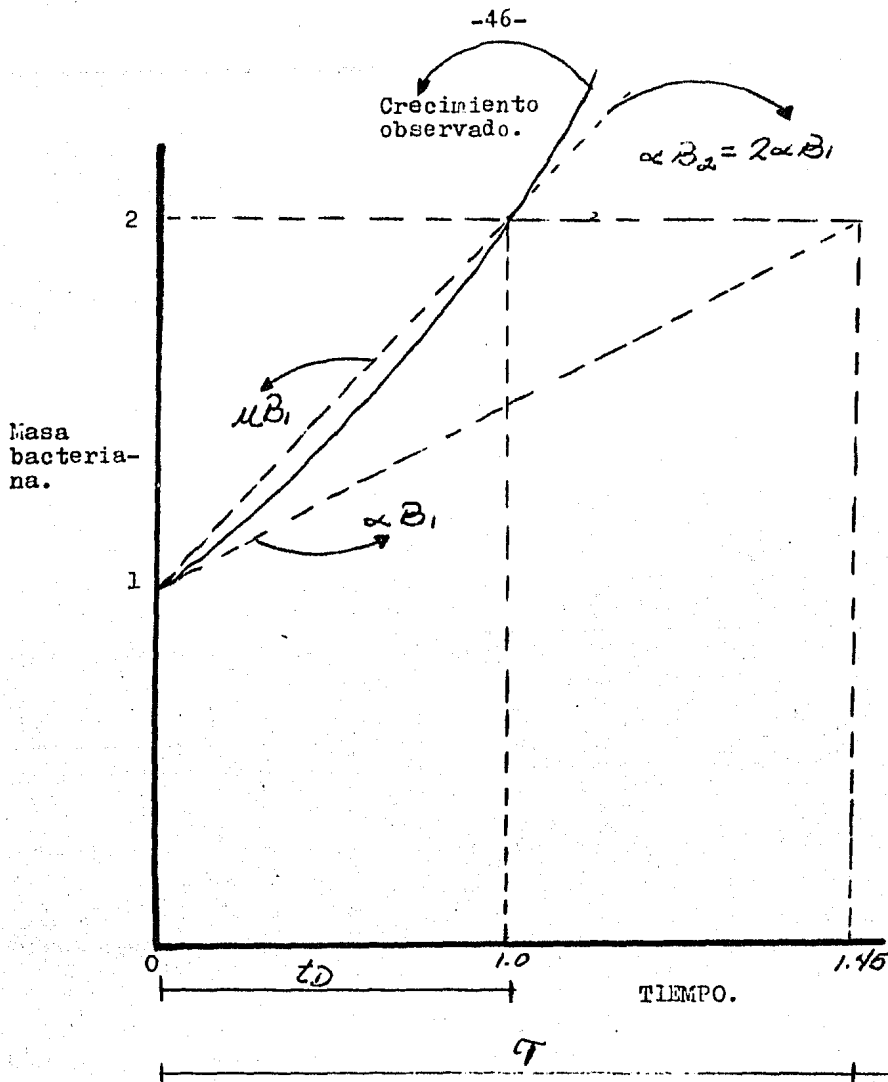


Fig. 6 .- Relación entre tiempo de duplicación exponencial ( $t_D$ ), constante de la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de generación ( $T = 1/\mu$ ) lineal (instantáneo).

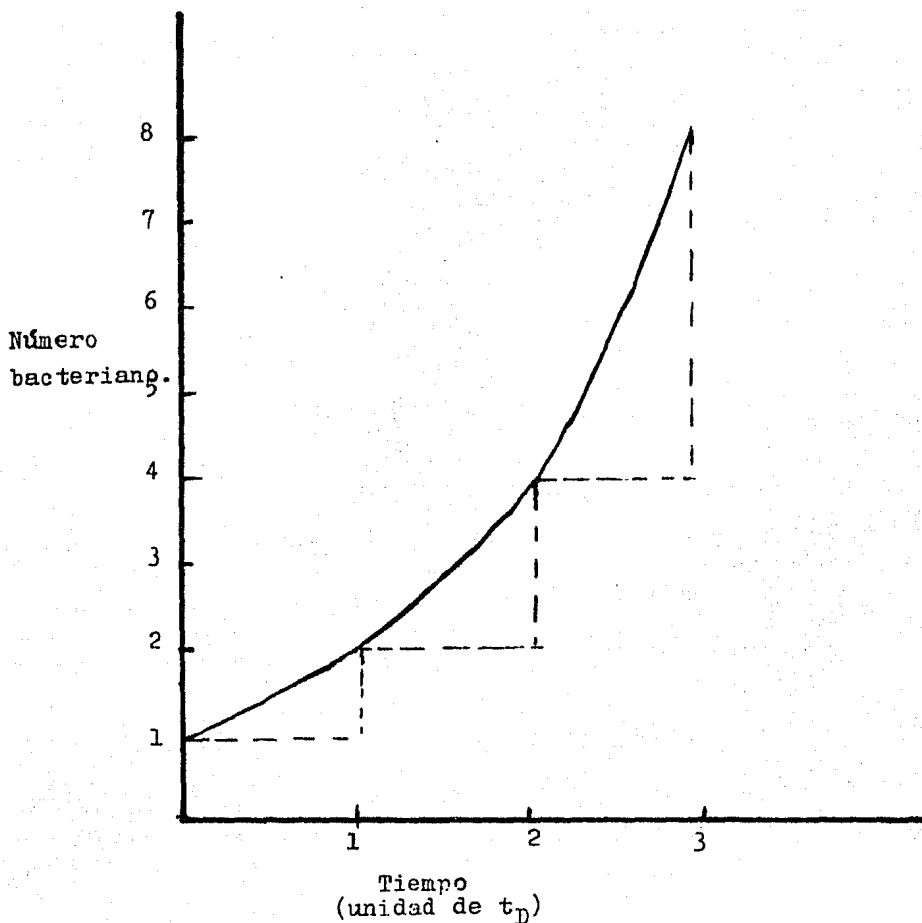


Fig. 7 .- Gráfica aritmética del incremento del número de células en el crecimiento exponencial hipotéticamente sincrónico (línea de trazo interrumpido) y asincrónico (línea de trazo continuo). En los dos tipos de crecimiento, la masa seguiría la línea continua.

## 2.0.0 OBJETIVO.

El objetivo que persigue el siguiente trabajo es el de estudiar materias primas, como extractos y peptonas, utilizados en el desarrollo microbiano (p. ej. formulación de medios de cultivo). Basándose dicho estudio en curvas de crecimiento (como parámetro microbiológico), de S. aureus y E. coli, en los diferentes sustratos utilizados.

3.0.0. MATERIAL Y METODO.

3.1.0 Material y aparatos.

- 1.- 2 matraces de 3000 ml.
- 2.- 6 matraces de 1000 ml.
- 3.- 2 matraces de 300 ml.
- 4.- 5 matraces de 50 ml.
- 5.- 6 tapones de hule horadados.
- 6.- Conexiones de vidrio para 6 matraces de 1000 ml.
- 7.- Conexiones de latex.
- 8.- 6 jeringas de 20 ml.
- 9.- 6 tubos de 20 ml con tapón de baquelita diametro de 1/2 pul.
- 10.- 15 pipetas de capacidad de 1 ml y de sensibilidad de 0.01 ml.
- 11.- 5 pipetas de capacidad de 5.0 ml volumétricas.
- 12.- 2 probetas de 50 ml, graduadas.
- 13.- 1 probeta de 1000 ml, graduada.
- 14.- Balanza Mettler capacidad 120 g. y sensibilidad de 0.01 g. tipo P-120.
- 15.- Fotómetro modelo H, (e. Leitz Inc. New York).
- 16.- 4 celdas de precisión (e. Leitz Inc. New York).
- 17.- Potenciómetro Beckman, Zeromatic<sup>R</sup> PHMETER.
- 18.- 1 baño maria con agitación y recirculación de agua.
- 19.- 1 baño maria sencillo, marca Kinet para medición de pH a 37°C.
- 20.- 5 vasos de precipitados de 40 ml para medición de pH.
- 21.- 1 caja de portaobjetos con 50 piezas.
- 22.- 2 asas de platino.
- 23.- 1 mechero.
- 24.- 1 charola de gram.
- 25.- 1 microscopio.
- 26.- 1 cuaderno de notas.
- 27.- Hojas semilogarítmicas.

3.2.0 Soluciones.

1.- Solución salina fisiológica (0.9%).

Agua destilada	4 000 ml
Cloruro de sodio	36 g.

2.- Caldo nutritivo estándar II (pH= 7.4-7.6).

Peptona de carne	4.3 g.
Peptona de caseína	4.3 g.
Cloruro de sodio	6.4 g.
Agua destilada	1 000 ml.

3.- Colorantes de gram.

3.1 Oxalato de amonio-cristal violeta.

-Solución A.

Cristal violeta	10 g.
Etanol (95%)	100 ml.

Mezclar y disolver.

-Solución B.

Oxalato de amonio solución acuosa al 1%.

Para su empleo mezclar 20 ml de la solución A y 80 ml de B.

3.2 Lugol. (28)

Yodo	5.0 g.
Yoduro de potasio	10.0 g.
Agua destilada	1 500 ml.

Triturar en un mortero el yodo y el yoduro de potasio y añadir algunos ml de agua poco a poco hasta conseguir su disolución. Almacenar en botella oscura.

3.3 Acetona.

3.4 Safranina al 0.5% .

3.5 Formol al 10 %.

3.3.0 Materias primas (M.P.).

CLAVE:

Longitud de onda- M.P. -Microorganismo-Orden número-Procedencia.

1.- Extracto de levadura.

550-El-EC-01, testigo, procedencia, Europa.  
550-El-SA-02, testigo, procedencia, Europa.  
550-El-EC-03, testigo, procedencia, Europa.  
550-El-SA-04, testigo, procedencia, Europa.  
550-El-EC-05, testigo, procedencia, Europa.  
550-El-SA-06, testigo, procedencia, Europa.  
550-El-EC-07, testigo, procedencia, Europa.  
550-El-SA-08, testigo, procedencia, Europa.  
550-El-EC-09, testigo, procedencia, Europa.  
550-El-SA-10, testigo, procedencia, Europa.

2.- Extracto de carne.

550-Ec-EC-01, testigo, procedencia, Europa.  
550-Ec-SA-02, testigo, procedencia, Europa.  
550-Ec-EC-03, testigo, procedencia, Europa.  
550-Ec-SA-04, testigo, procedencia, Europa.

3.- Peptona de carne (digestión péptica).

550-Pc-PEC-01, testigo, procedencia, Europa.  
550-Pc-PEC-02, testigo, procedencia, Europa.  
550-Pc-PSA-03, testigo, procedencia, Europa.  
550-Pc-PEC-04, problema, procedencia, Europa.  
550-Pc-PEC-05, problema, procedencia, E.E.U.U.  
550-Pc-PSA-06, problema, procedencia, Europa.  
550-Pc-PSA-07, problema, procedencia, E.E.U.U.

4.- Peptona de carne (digestión triptica).

550-Pc-TEC-01, testigo, procedencia, Europa.  
550-Pc-TSA-02, testigo, procedencia, Europa.  
550-Pc-TEC-03, testigo, procedencia, Europa.  
550-Pc-TSA-04, testigo, procedencia, Europa.

- 5.- Peptona de caseína (digestión triptica).
- 550-Pc-EC-01, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-Pc-EC-02, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-Pc-SA-03, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-Pc-EC-04, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-Pc-SA-05, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-Pc-EC-06, problema, procedencia, E.E.U.U.
  - 550-Pc-EC-07, problema, procedencia, E.E.U.U.
  - 550-Pc-EC-08, problema, procedencia, E.E.U.U.
  - 550-Pc-SA-09, problema, procedencia, E.E.U.U.
  - 550-Pc-EC-10, problema, procedencia, E.E.U.U.
  - 550-Pc-SA-11, problema, procedencia, E.E.U.U.
- 6.- Peptona de Harina de soya.
- 550-PHS-EC-01, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-PHS-EC-02, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-PHS-SA-03, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-PHS-SA-04, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-PHS-EC-05, problema, procedencia, Europa.
  - 550-PHS-EC-06, problema, procedencia, Europa.
  - 550-PHS-SA-07, problema, procedencia, Europa.
  - 550-PHS-SA-08, problema, procedencia, Europa.
- 7.- Peptona de gelatina.
- 550-Pg-EC-01, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-Pg-EC-02, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-Pg-SA-03, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-Pg-SA-04, testigo, procedencia, Europa.
  - 550-Pg-EC-05, problema, procedencia, México.
  - 550-Pg-EC-06, problema, procedencia, México.
  - 550-Pg-EC-07, problema, procedencia, México.
  - 550-Pg-EC-08, problema, procedencia, México.
  - 550-Pg-SA-09, problema, procedencia, México.
  - 550-Pg-SA-10, problema, procedencia, México.
  - 550-Pg-SA-11, problema, procedencia, México.
  - 550-Pg-SA-12, problema, procedencia, México.

3.4.0 Cepas utilizadas.

- 1.- *Escherichia coli*.
- 2.- *Staphylococcus aureus*.

3.5.0 Técnica.

- 1.- Preparar 4000 ml de solución salina fisiológica.
- 2.- Preparar 3 matraces de 50 ml con 25 ml de caldo nutritivo estándar II y esterilizar.
- 3.- Preparar 8 tubos con tapón de rosca, con 9.0 ml de la solución salina fisiológica preparada en el punto N°1 y 2 matraces de 300 ml con 135 ml de la solución salina fisiológica (estos matraces serán la dilución  $10^{-4}$ ).
- 4.- Ajustar los baños maría a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- 5.- Ajustar el potenciómetro Beckman.
- 6.- Inocular el caldo nutritivo estándar II con *E. coli* y *S. aureus* e incubar 20 horas en baño maría con agitación.
- 7.- Tomar 1500 ml de solución salina fisiológica del punto N°1 y agregar 15 g. de materia prima problema (solución al 1%) .
- 8.- Ajustar esta última solución el pH= 7.3-7.5 y distribuir en 3 partes iguales de 450 ml en matraces de 1000 ml.
- 9.- Poner el tapón de hule con las conexiones de vidrio unidas a su respectiva jeringa de 20 ml, y esterilizar todo en conjunto.



10.- Repetir los pasos 7,8,9, para la preparación del testigo.

11.- Del punto N'6, despues de 20 horas de incubación estandarizar las cepas, E. coli y S. aureus, a 60% de transmitancia, en el fotómetro modelo H.

12.- Ya que se tienen las cepas estandarizadas se hacen diluciones de cada una de las cepas,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ; (ver punto N'3) obteniendose de esta ultima dilución un mínimo de 150 ml de inculo en un matraz de 300 ml.

13.- Se inocula con 50 ml de las diluciones  $10^{-4}$  obtenidas en el punto anterior de la siguiente manera, en:

1 matraz con 50 ml de la dilución de la cepa de E. coli ( $10^{-4}$ ).

1 matraz con 50 ml de la dilución de la cepa de S. aureus ( $10^{-4}$ ).

1 matraz no se inocula ya que servira como blanco para las lecturas en el fotómetro modelo H.

14.- Repetir el punto N' 13 para la materia prima testigo.

15.- Inoculados los matraces de la materia prima problema y de la materia prima testigo se ponen a incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño maria con agitación junto con los matraces que servirán como blancos para las lecturas.

16.- Dentro del período de incubación de los medios de cultivo de estudio inoculados con E. coli y S. aureus, se procede a efectuar la toma de las muestras cada 2,4,8,16,24. horas, con el fin de establecer una curva logarítmica de crecimiento bacteriano.

17.- La toma de la muestra se efectúa por medio de la jeringa de 20 ml, esteril conectada a un tubo que desciende hasta el medio de cultivo. La muestra tomada es de 15 ml. Se hace un frotis para identificación y la muestra se inactiva con formol

al 10%, para evitar que *E. coli* o *S. aureus* se sigan desarrollando y de esta manera se obtengan falsos resultados, si la muestra no puede ser leída inmediatamente.

Procurar purgar el tubo que desciende al medio de cultivo cada vez que sea tomada la muestra.

18.- A las muestras tomadas se mide la absorbancia en el fotómetro modelo H. a  $\lambda = 550\text{nm}$  y se anotan los resultados, los cuales se grafican en papel semilogarítmico, (absorbancia v.s. horas).

DIAGRAMA N° I

Parte N° I

Caldo nutritivo estandar  
N° II. 3 matraces con 25  
ml.

Inocular de la siguiente  
manera:  
1 matraz con E. coli.  
1 matraz con S. aureus.  
1 matraz como blanco.

Precultivo de 20 horas  
en baño maría.

Ajuste de las cepas de  
E. coli y S. aureus a  
60% +/- 1 de transmi-  
sion,  $\lambda = 550\text{nm}$ .

Hacer diluciones,  $10^{-1}$ ,  
 $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , de cada  
una de las cepas estan-  
darizadas.

obtener un minimo de  
250ml de la dilución  $10^{-4}$   
que es la que servirá como  
inoculo.

PARTE N° II

1500 ml de solución salina fisiológica más 15 g. de materia prima problema. Solución al 1%. pH= 7.3-7.5 .

1.-450 ml solución al 1% de materia prima testigo más 50ml de la dilución de  $10^{-4}$  de E. coli.

Periodo de incubación toma de muestras, tiempos: 2, 4, 8, 16, 24, horas. Hacer frotis de las muestras.

2.-450 ml solución al 1% de materia prima testigo más 50 ml de la dilución  $10^{-4}$  de S. aureus.

Periodo de incubación toma de muestras, tiempos; 2, 4, 8, 16, 24, horas. Hacer frotis de las muestras.

3.-450 ml solución al 1% de materia prima testigo sin inoculo.

Periodo de incubación toma de muestras en los tiempos; 2, 4, 8, 16, 24, horas. Usar estas muestras como blancos. Hacer frotis de las muestras.

1500 ml solución salina fisiológica más 15 g. de materia prima testigo. Solución al 1% pH = 7.3-7.5 .

1.-450 ml solución al 1% de materia prima problema mas 50 ml de la dilución  $10^{-4}$  de E. coli.

Periodo de incubación toma de las muestras en los tiempos; 2,4,8,16,24, horas. Hacer frotis de las muestras.

2.-450 ml solución al 1% de materia prima problema mas 50 ml de la dilución  $10^{-4}$  de S.aureus.

Periodo de incubación toma de las muestras en los tiempos; 2,4,8,16,24, horas. Hacer frotis de las muestras

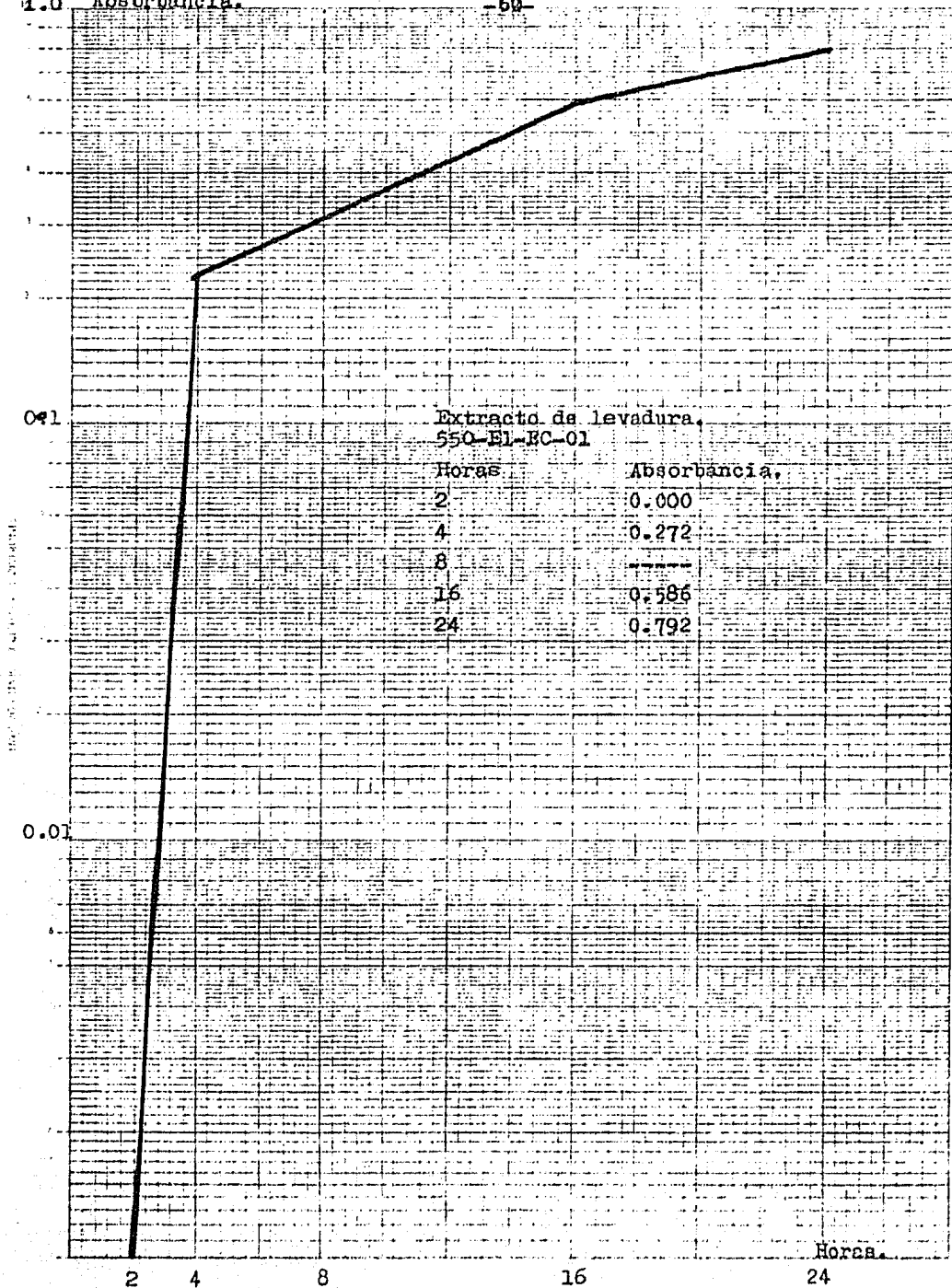
3.-450 ml solución al 1% de materia prima problema sin inóculo.

Periodo de incubación toma de muestras, tiempos; 2,4,8, 16,24, horas. Usar estas muestras como blancos. Hacer frotis de las muestras.

#### 4.0.0 RESULTADOS

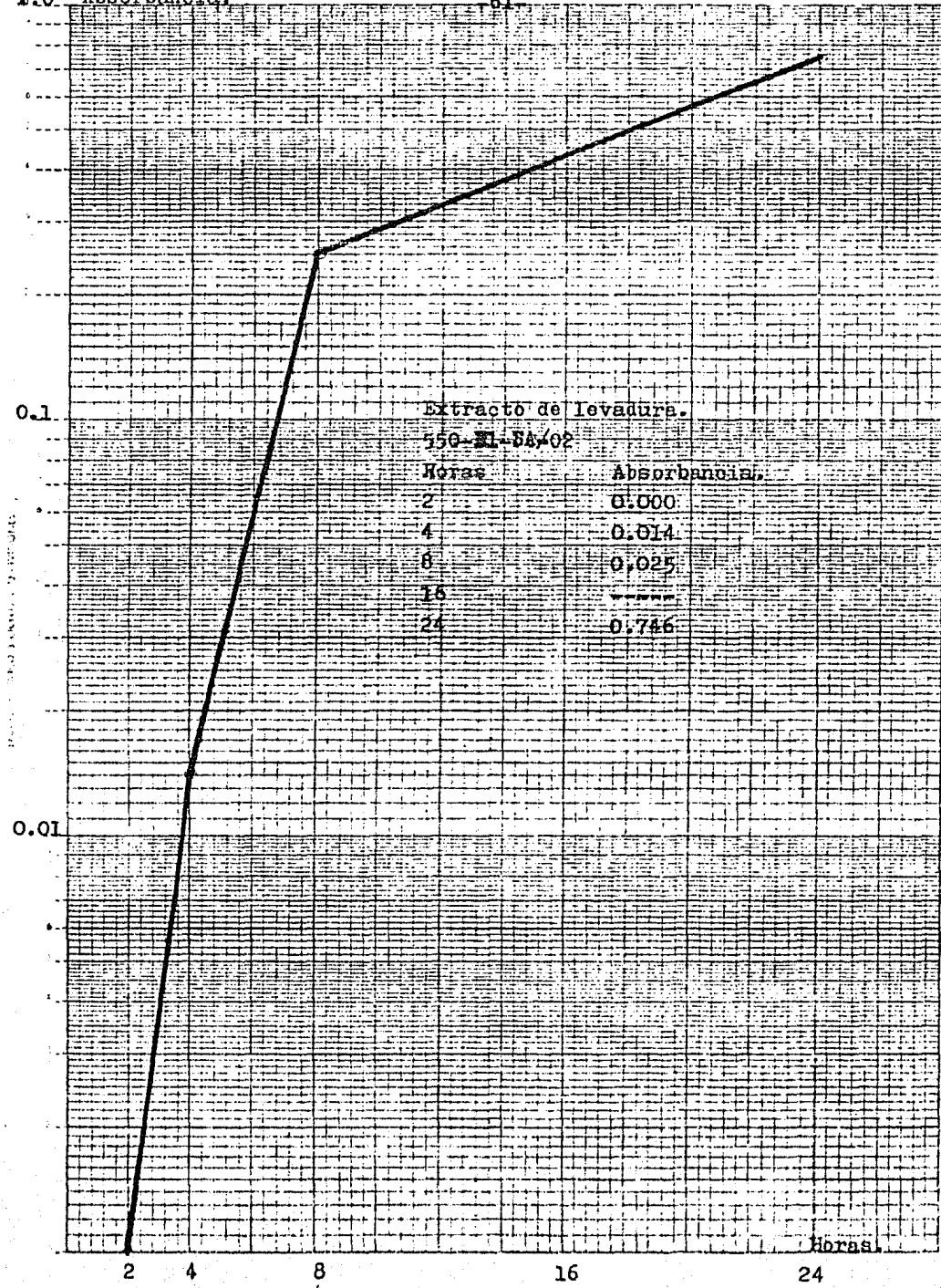
1.0 Absorbancia.

-69-



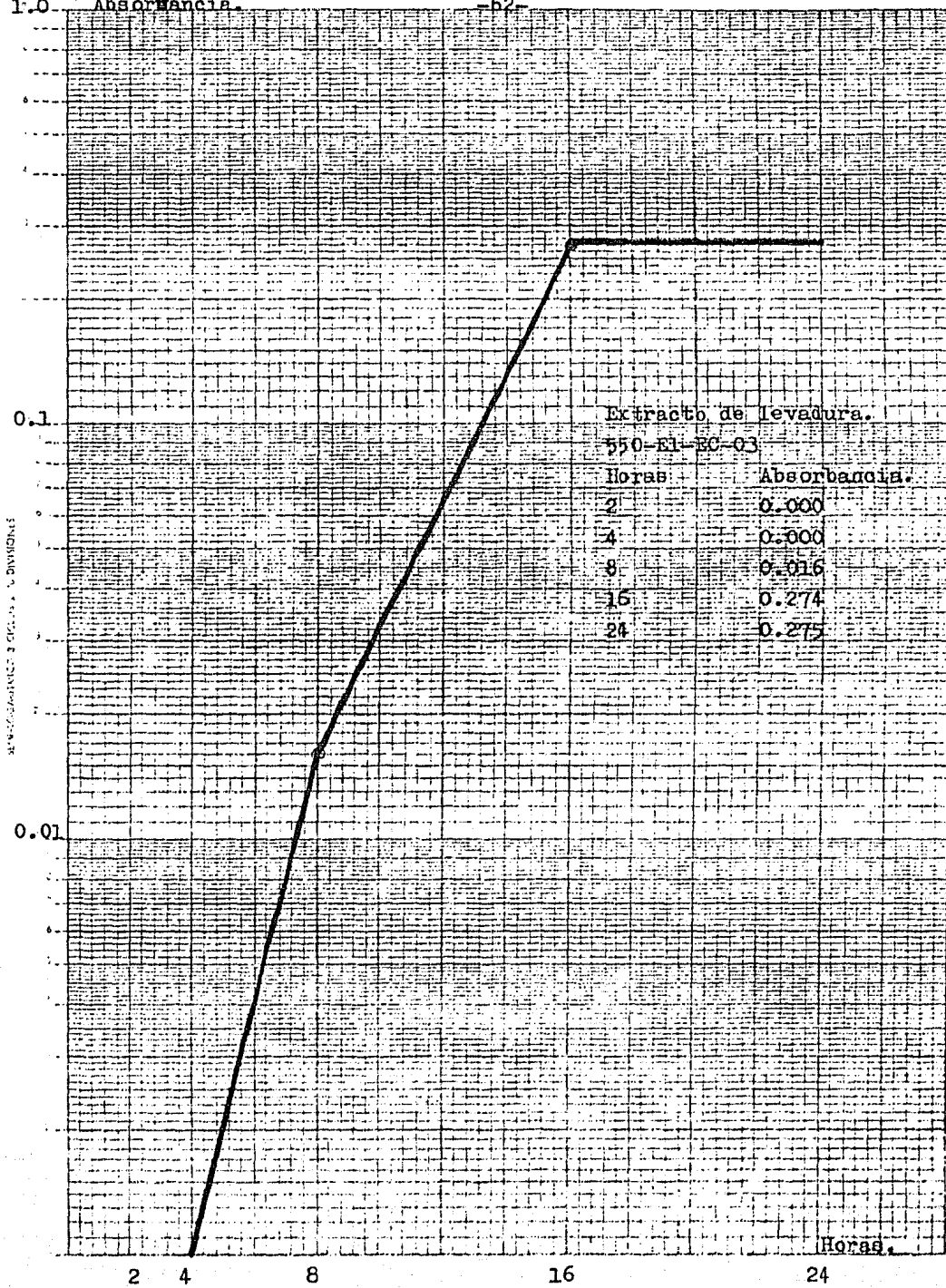
1.0 Absorbancia.

61



3.17.1961





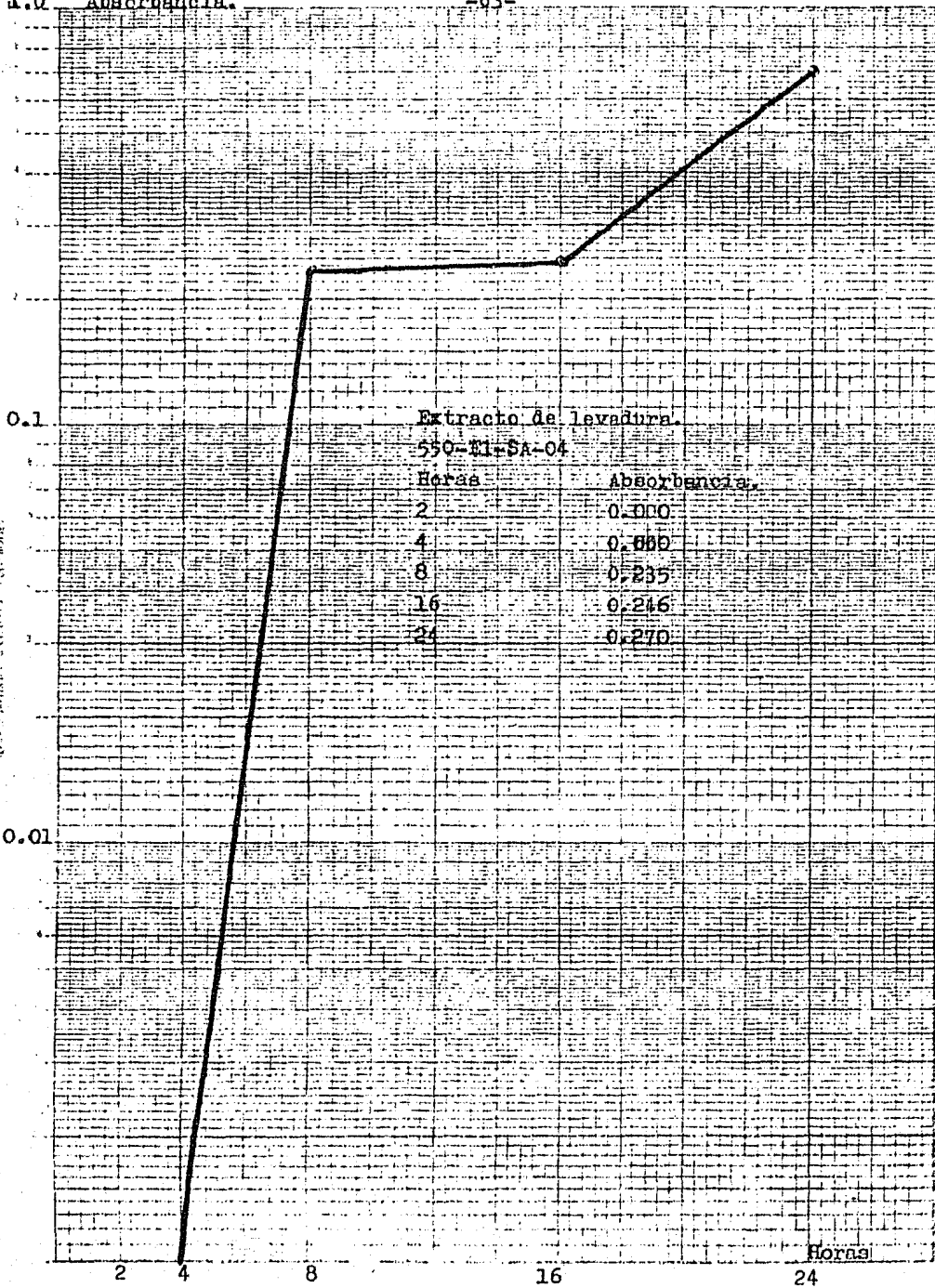
Extracto de levadura.

550-EI-EC-03

Horas	Absorbancia.
2	0.000
4	0.000
8	0.016
16	0.274
24	0.275

SEPARACIONES 3 CICLOS 1/2 DIVISIONES

Horas.



Extracto de levadura.

550-EI-SA-04

Horas Absorbancia.

2 0.000

4 0.000

8 0.235

16 0.246

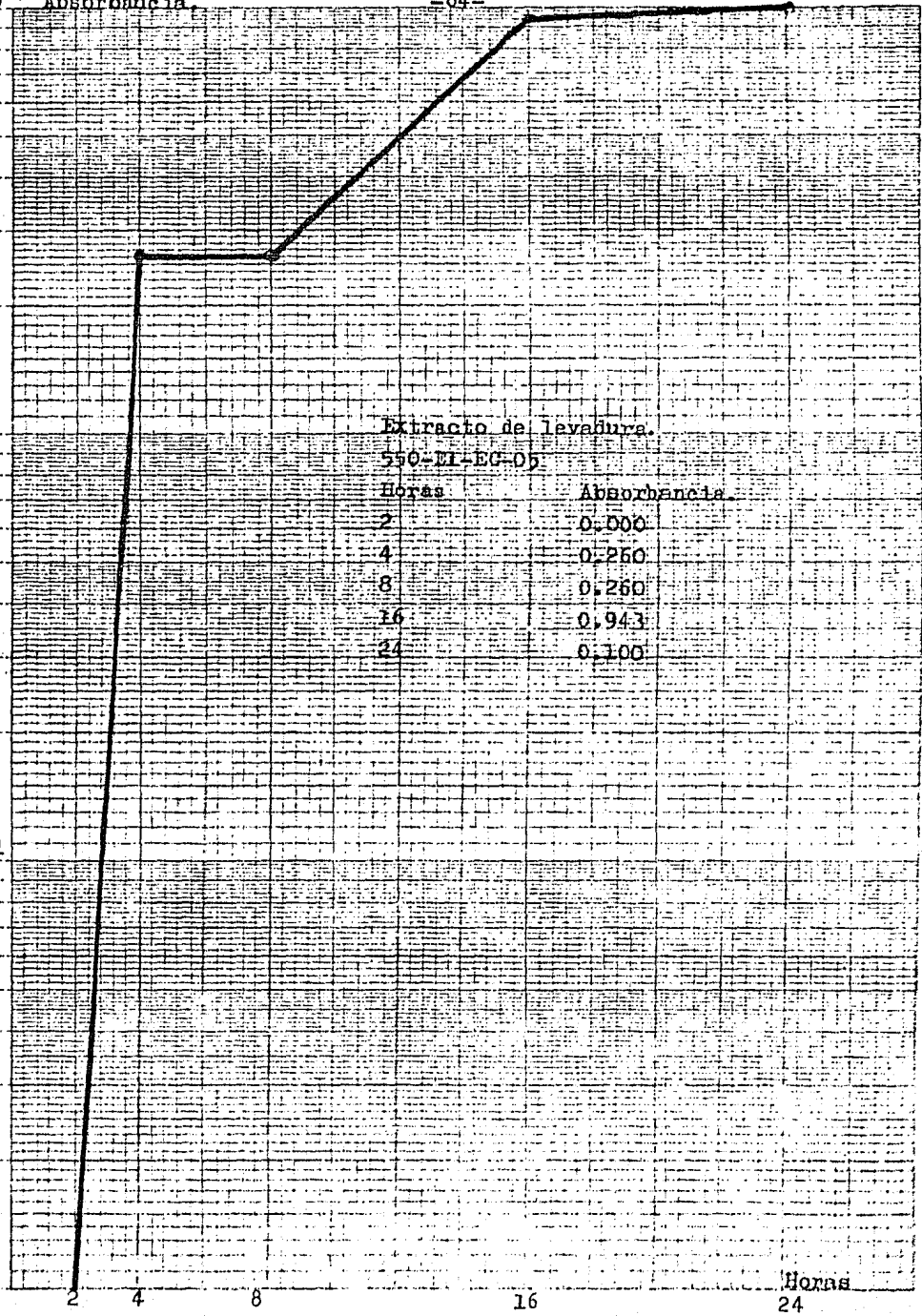
24 0.270

Horas

1.0 Absorbancia

-64-

SE-16, INSTRUMENTO 3 CICLOS, 13 DIVISIONES

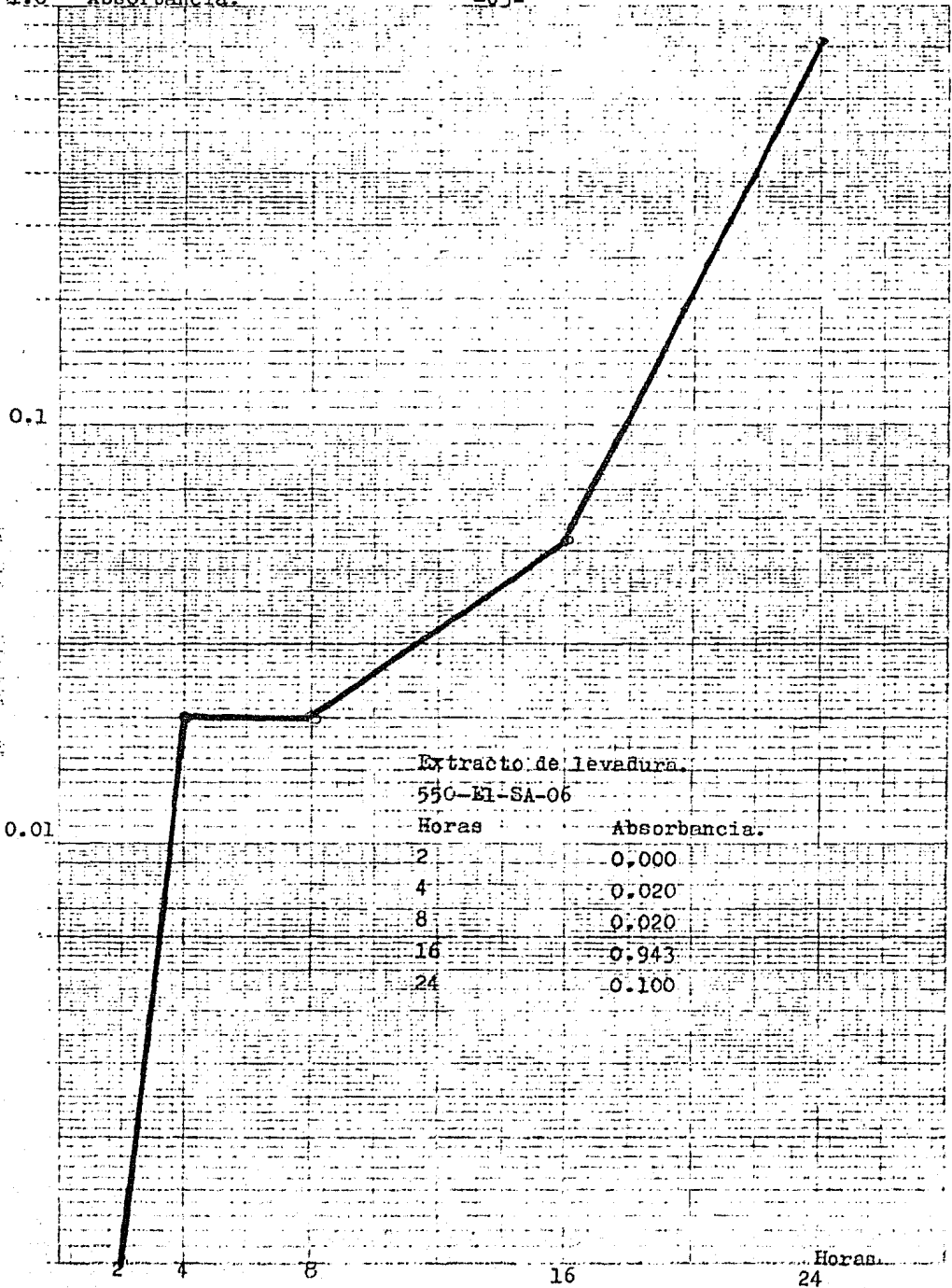


Extracto de levadura.

550-ET-EG-05

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.250
8	0.260
16	0.943
24	0.100

Horas  
24



Extracto de levadura.

550-El-SA-06

Horas Absorbancia.

2 0.000

4 0.020

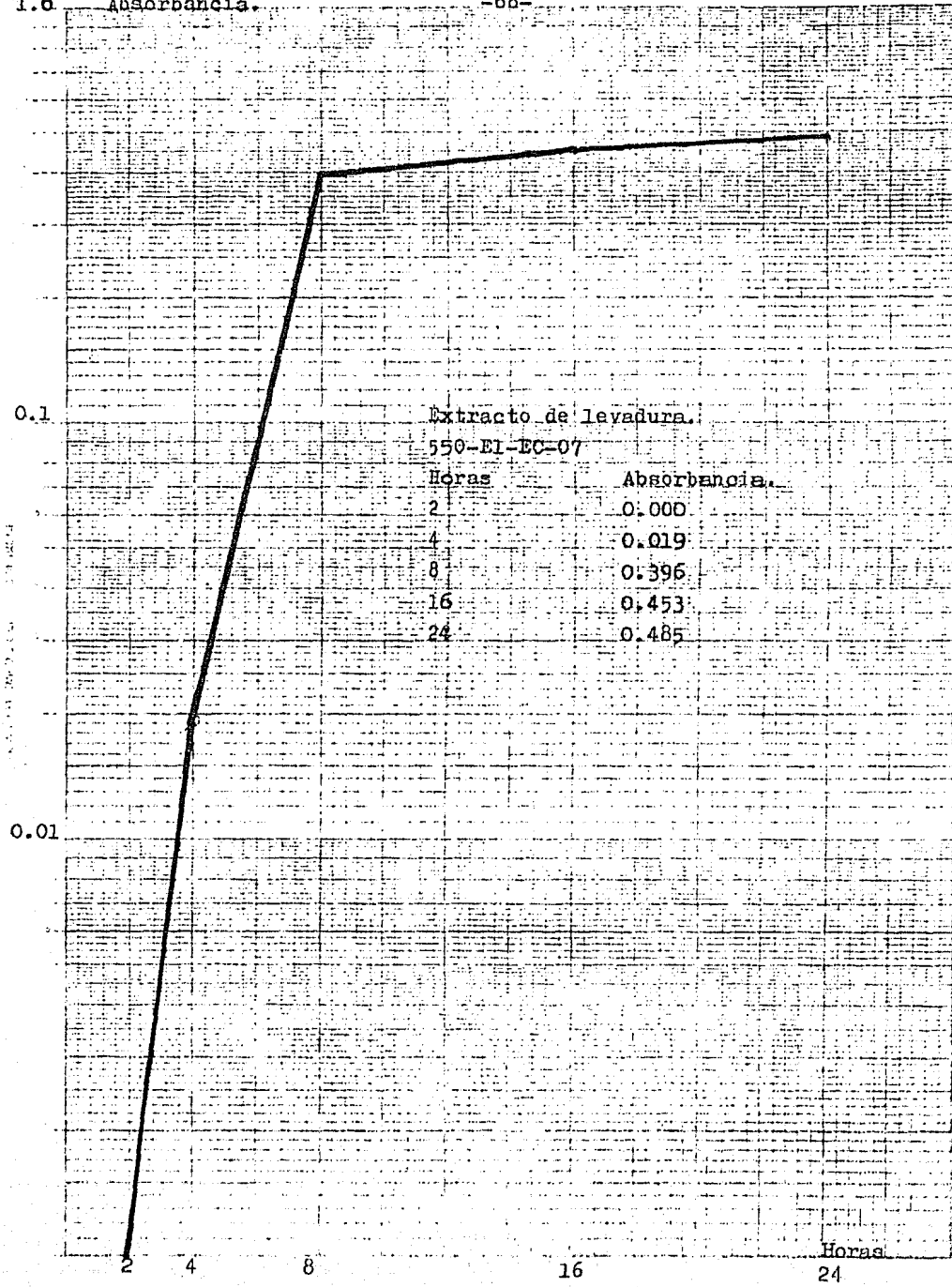
8 0.020

16 0.0943

24 0.100

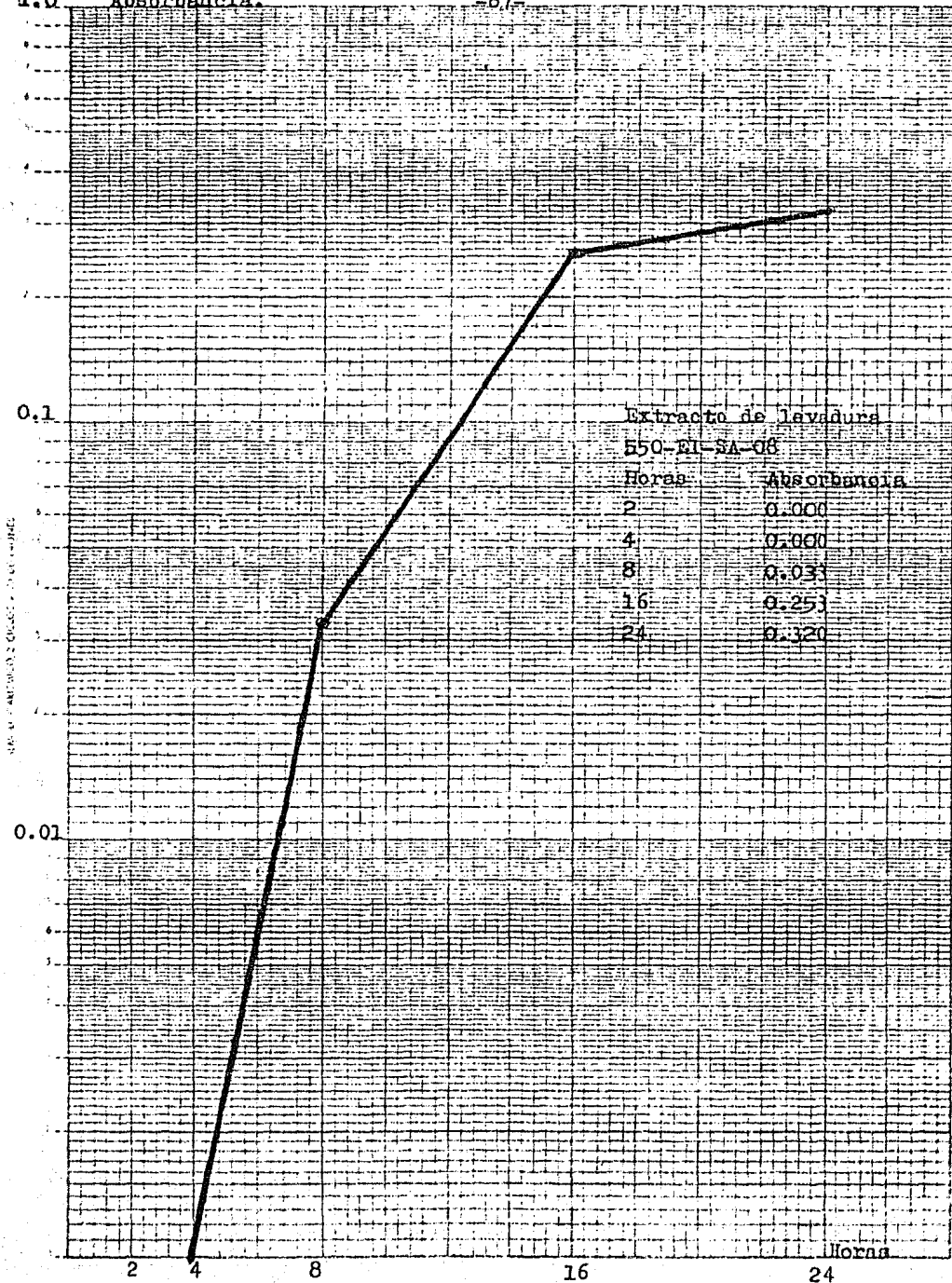
Horas

24

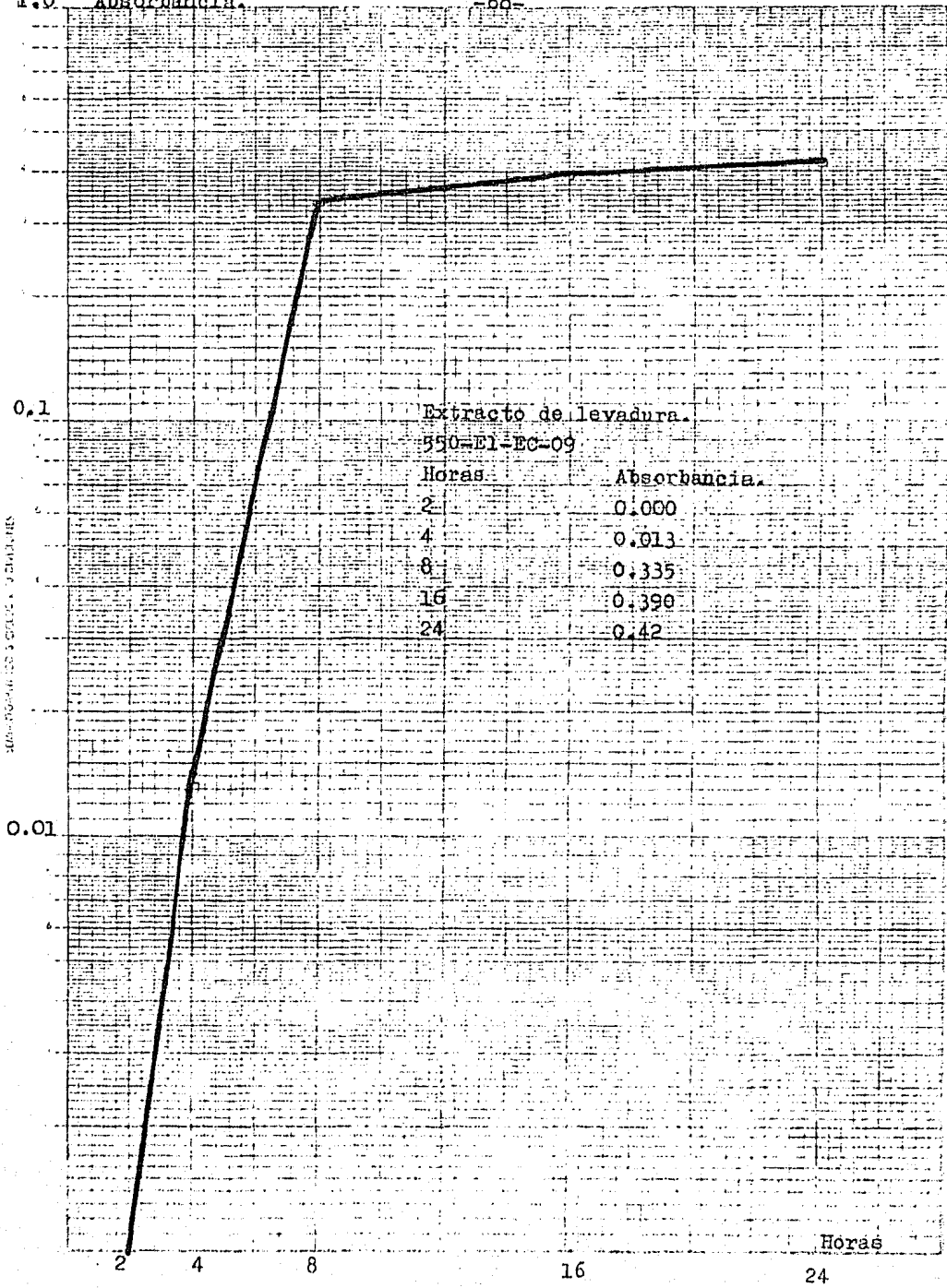


1.0 Absorbancia.

-67-



1.0 Absorbancia.



Extracto de levadura.  
550-EI-EC-09

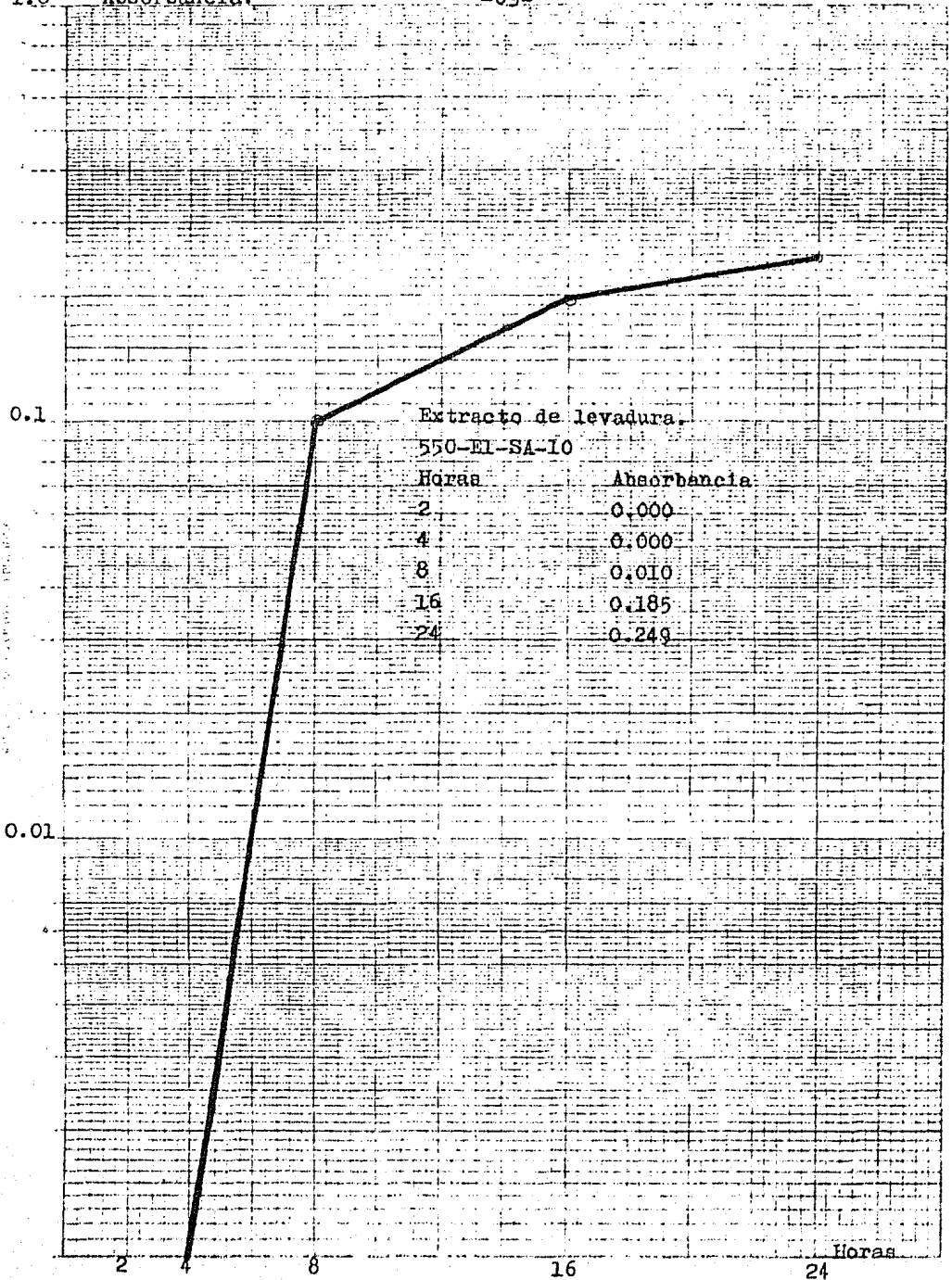
Horas	Absorbancia.
2	0.000
4	0.013
8	0.335
16	0.390
24	0.42

Horas

2 4 8 16 24

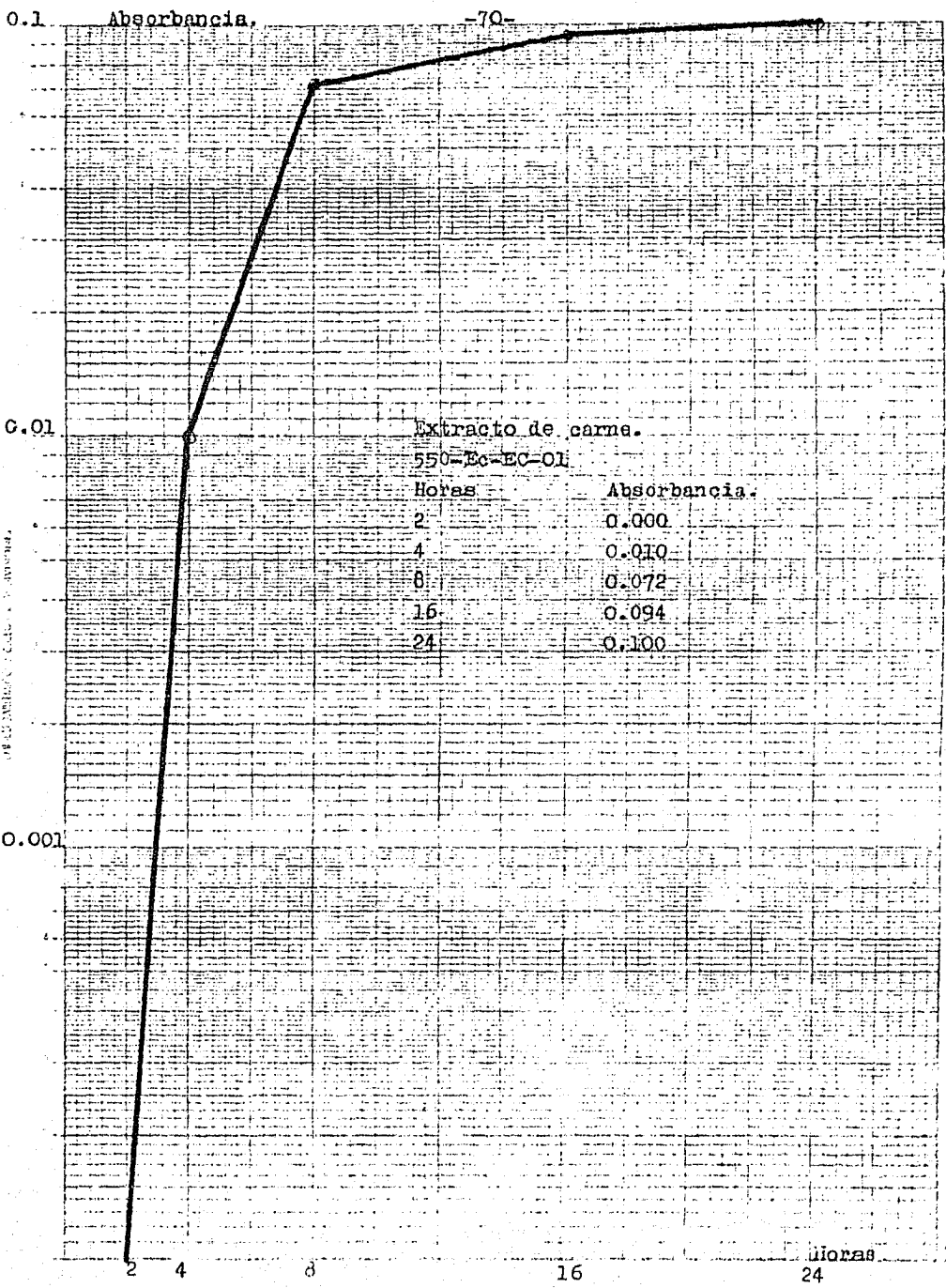
1.0 Absorbancia.

-69-



6





Extracto de carne.

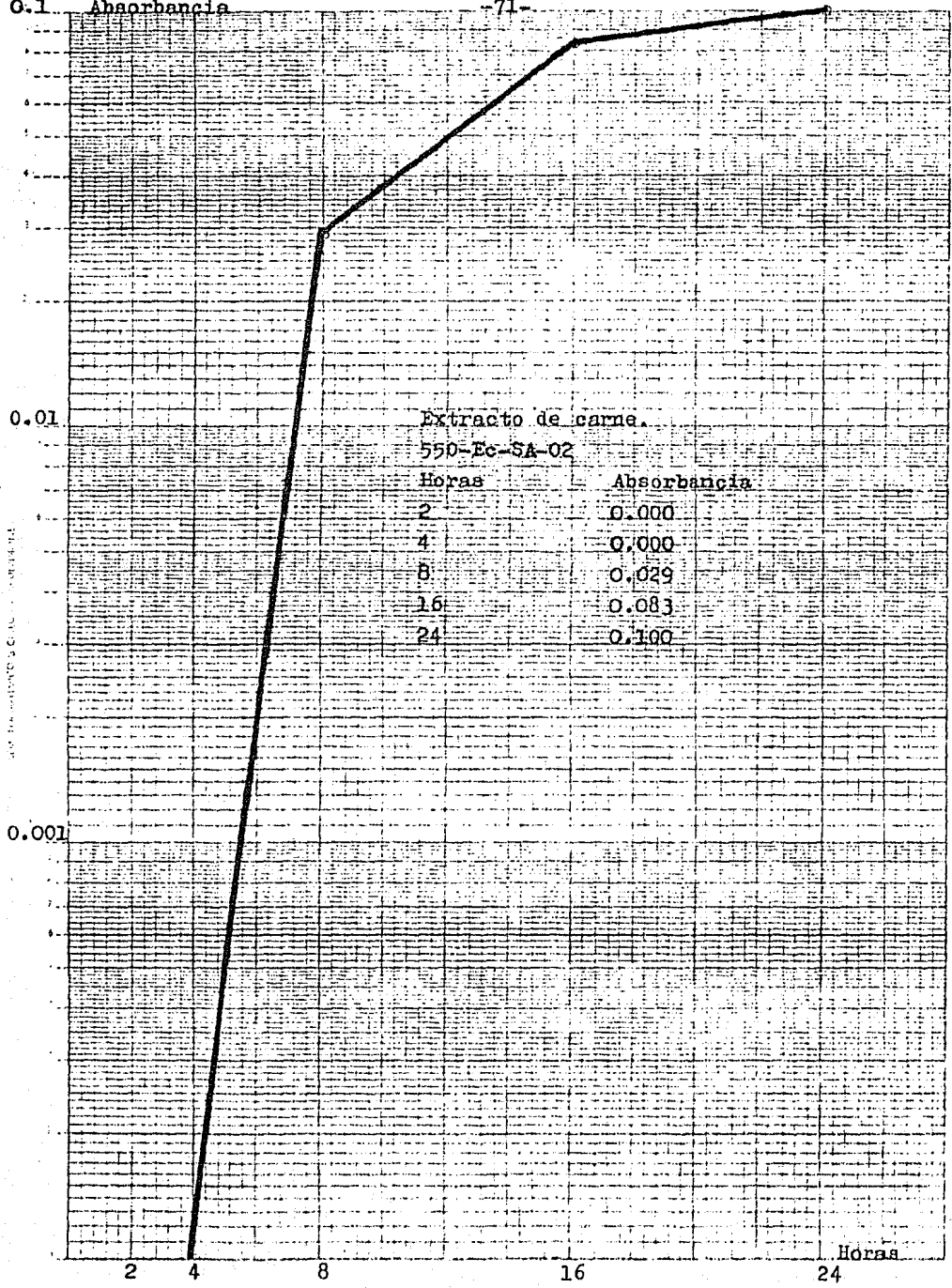
550-EC-EC-01

Horas	Absorbancia.
2	0.000
4	0.010
8	0.072
16	0.094
24	0.100

OFICINA DE INVESTIGACIONES

0.1 Absorbancia

-71-



Extracto de carne.

550-Ec-SA-02

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.000
8	0.029
16	0.083
24	0.100

Horas

2

4

8

16

24

0.1

Absorbancia.

-72-

0.01

0.001

Extracto de carne

550-Ec-EC-03

Horas

Absorbancia

2

0.000

4

0.012

6

0.061

16

0.086

24

0.094

Absorbancia

2

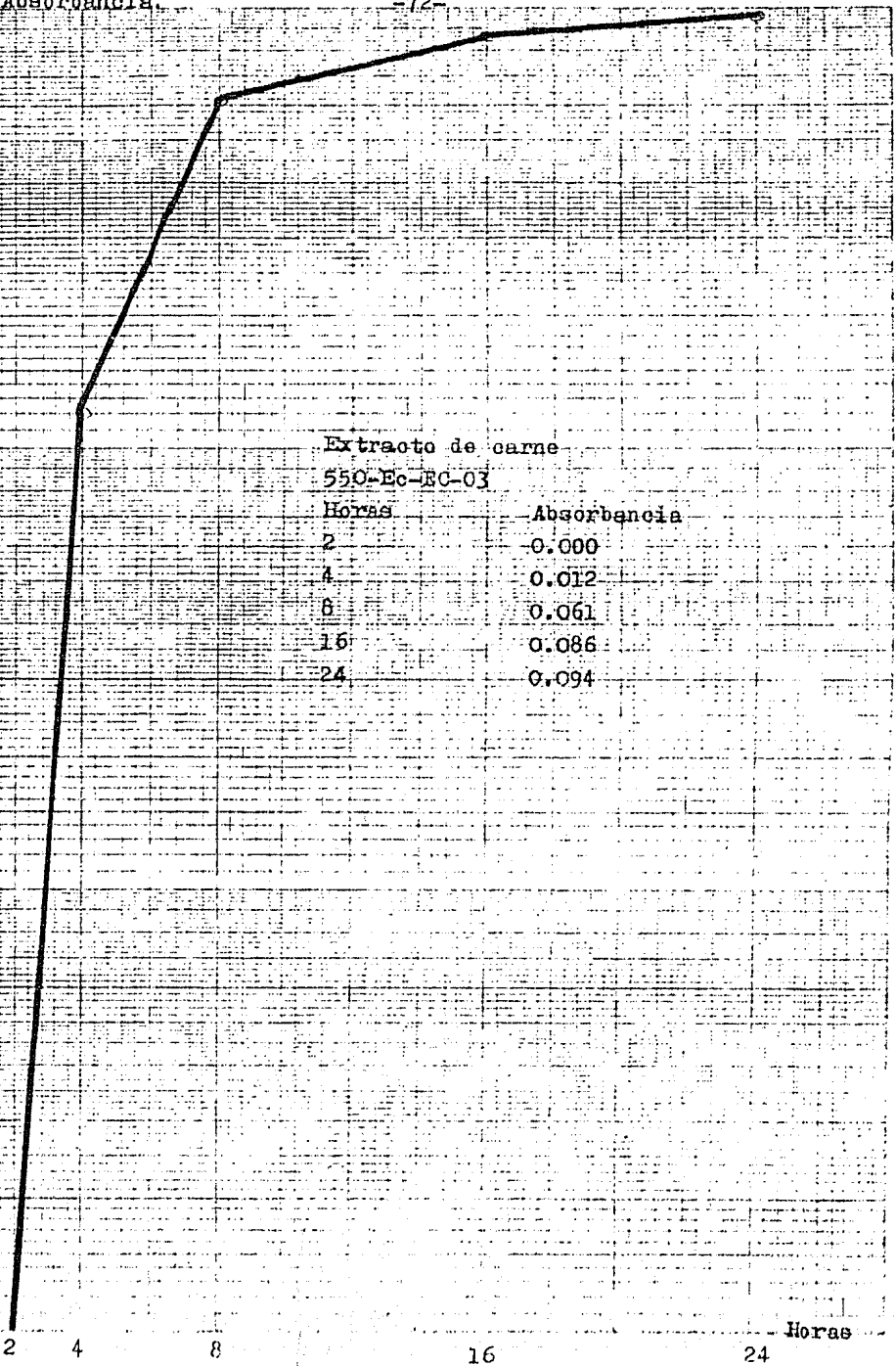
4

8

16

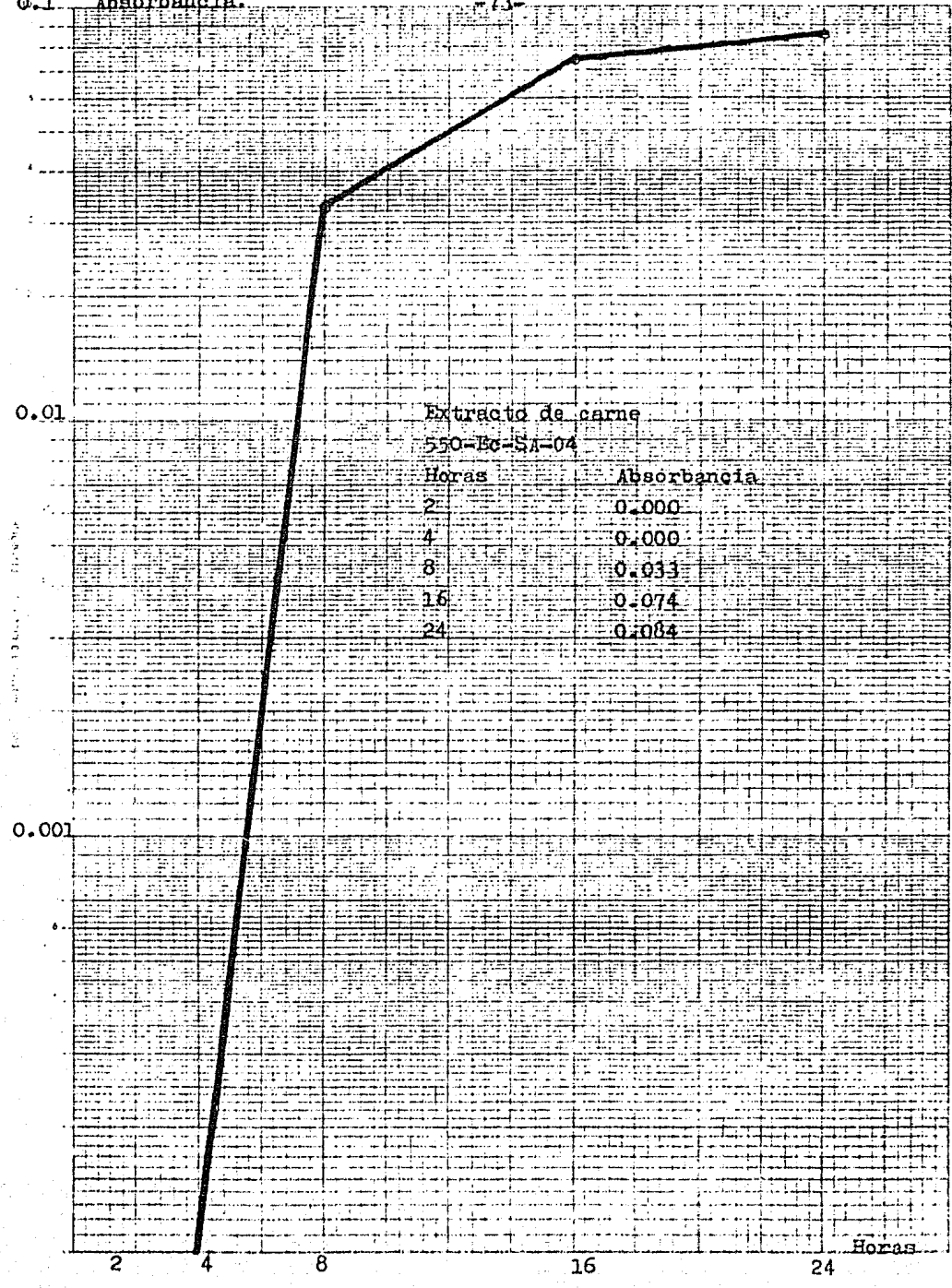
24

Horas



0.1 Absorbancia.

-73-



Extracto de carne  
550-Bc-SA-04

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.000
8	0.033
16	0.074
24	0.084

Horas

0.1

Absorbancia.

-74-

0.01

0.001

Peptono de carne (dig. péptica)

550-Pc-PEC-01

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.005
8	0.041
16	-----
24	0.100

2

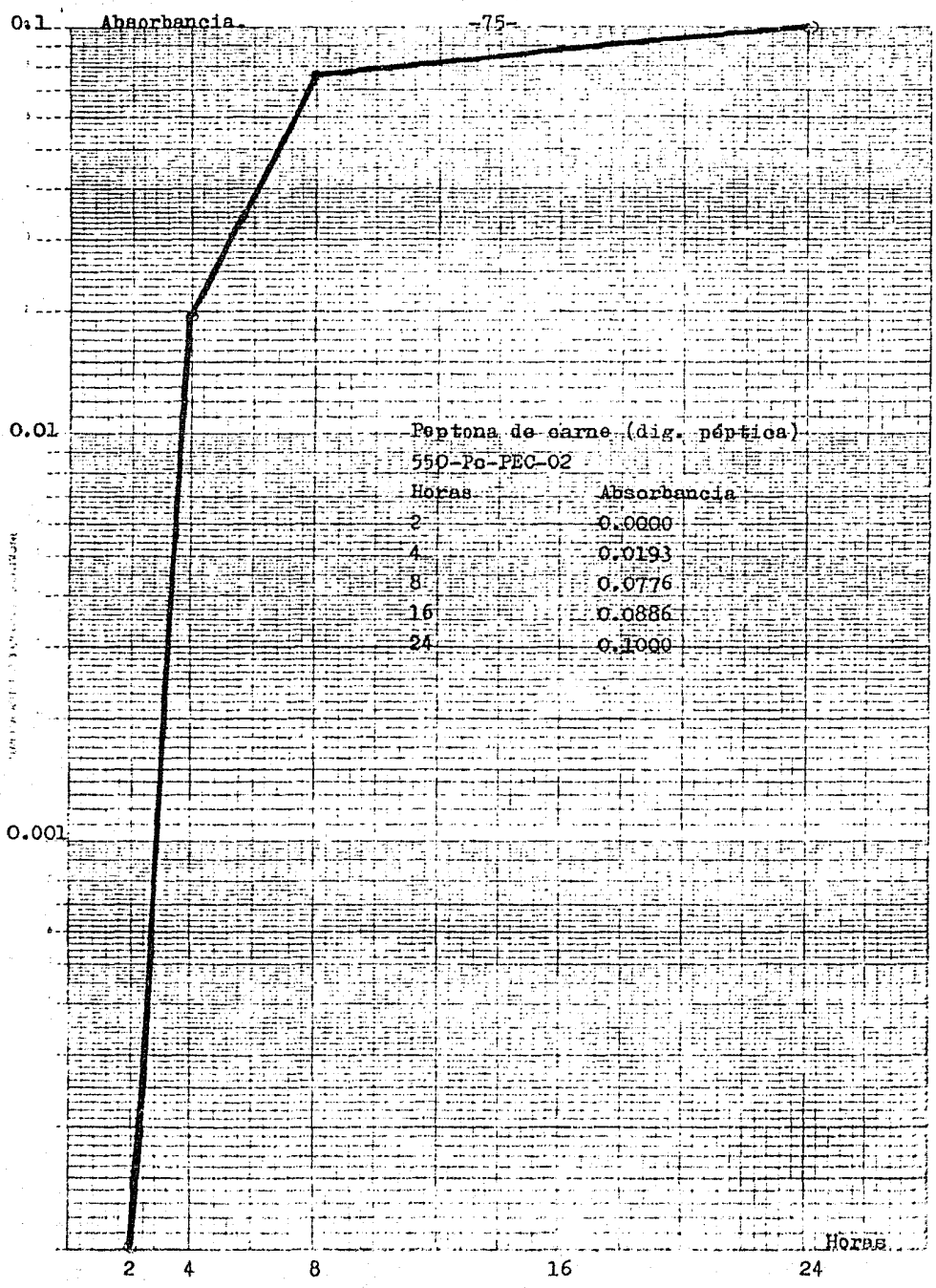
4

8

16

24

Horas



Peptona de carne (dig. péptica)  
550-Pc-PEC-02

Horas	Absorbancia
2	0.0000
4	0.0193
8	0.0776
16	0.0886
24	0.1000

0.1 Absorbancia

-76-

0.01

Peptona de carne (dig. péptica)

550-Pq-PSA-03

Horas

Absorbancia.

2

0.000

4

0.005

8

0.041

16

24

0.100

0.001

2

4

8

16

24

Horas

100.00 100.000 100.0000 100.00000

0.1 Absorbancia

-77-

0.01

Peptona de carne (dig. péptica)

550-Pc-PEC-04

Horas

Absorbancia

2

0.000

4

0.018

8

0.055

16

0.086

24

0.086

0.001

Horas

2

4

8

16

24

4485 - 10-10-70 B C-1 - 5 - 10-10-70



0.1

Absorbancia

-78-

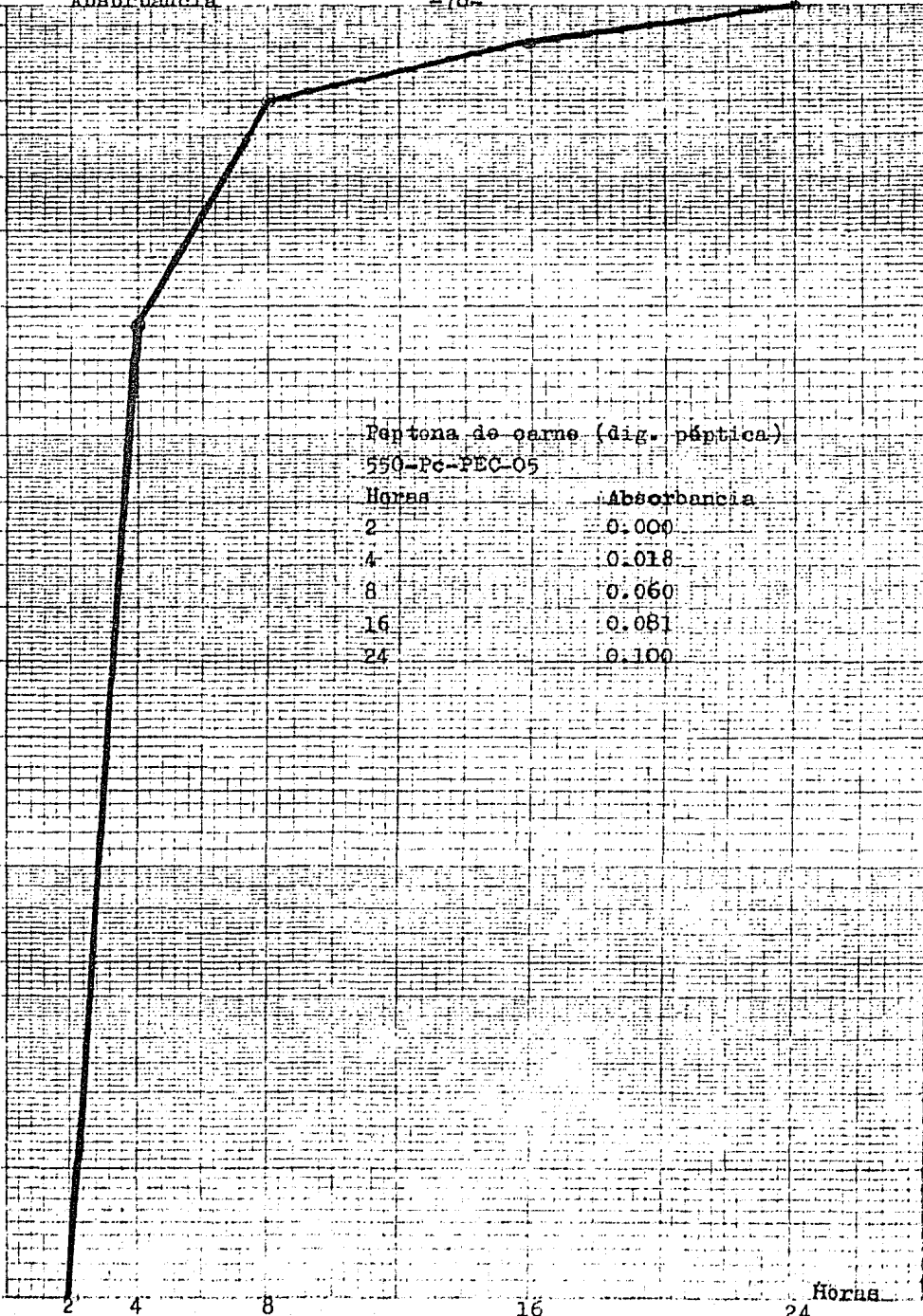
0.01

0.001

Peptona de carne (dig. péptica)

550-PC-PEC-05

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.018
8	0.060
16	0.081
24	0.100



Horas

24

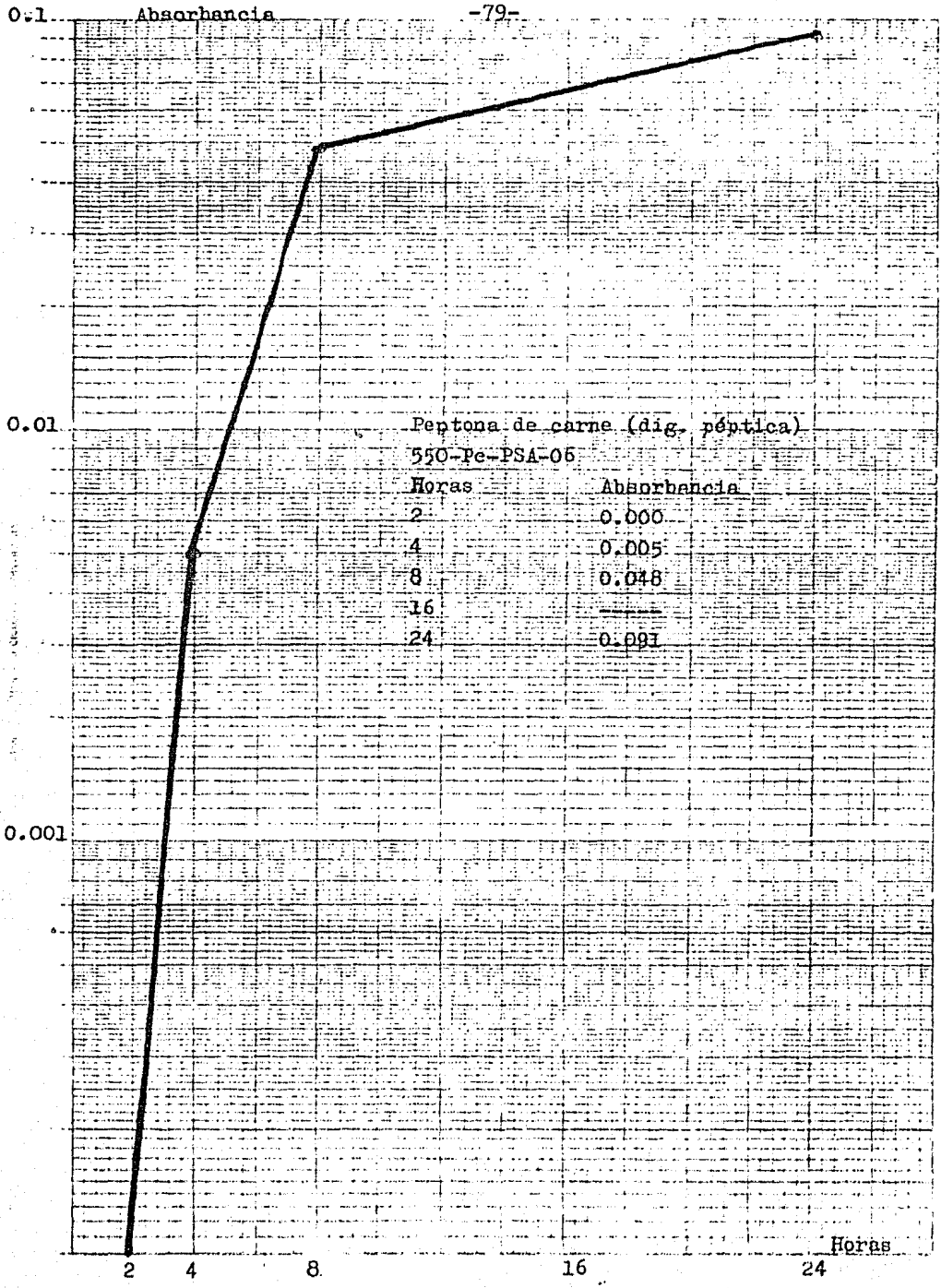
16

8

4

2

SENA-OC-AMIRACO I OCUS - 3 JUN 1972-78



Peptona de carne (dig. péptica)  
550-Pe-PSA-06

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.005
8	0.048
16	---
24	0.091

0.1

Absorbancia.

-80-

0.01

0.001

Peptona de carne (dig. péptica)

550-Pc-PSA-07

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.0000
8	0.010
16	0.044
24	0.080

2

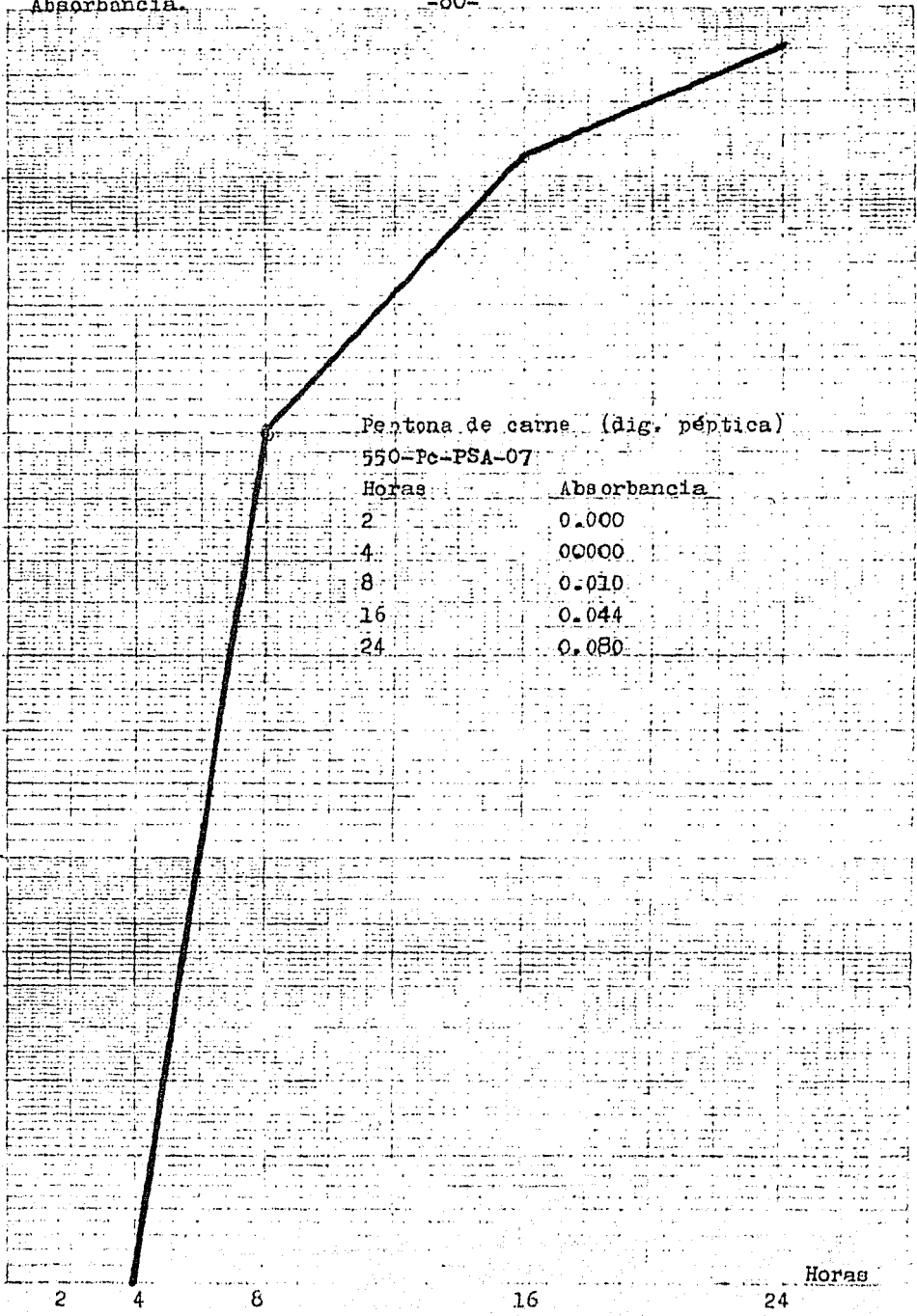
4

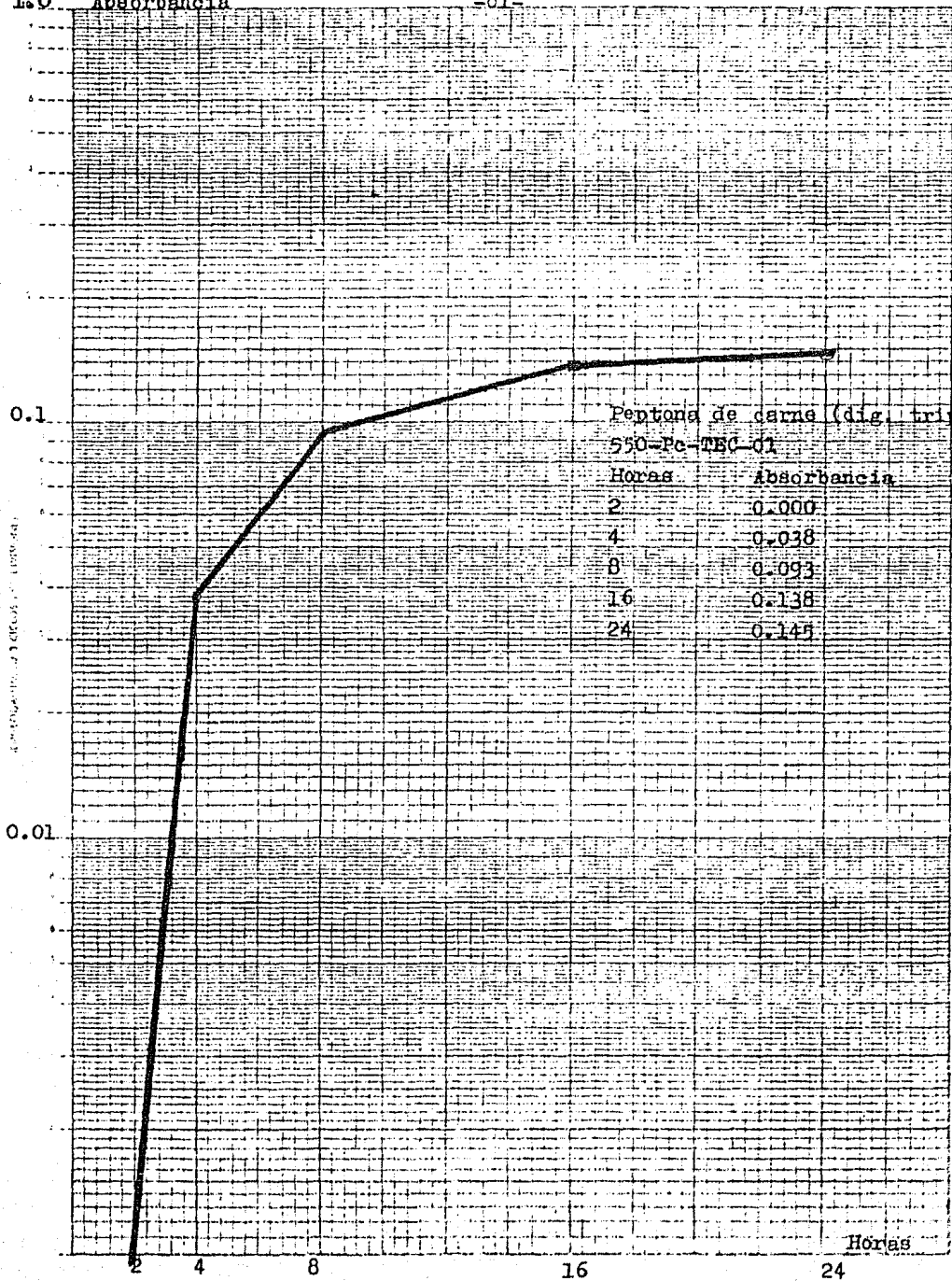
8

16

24

Horas





Peptonas de carne (dig. trip)

550-Pe-TEC-01

Horas Absorbancia

2 0.000

4 0.038

8 0.093

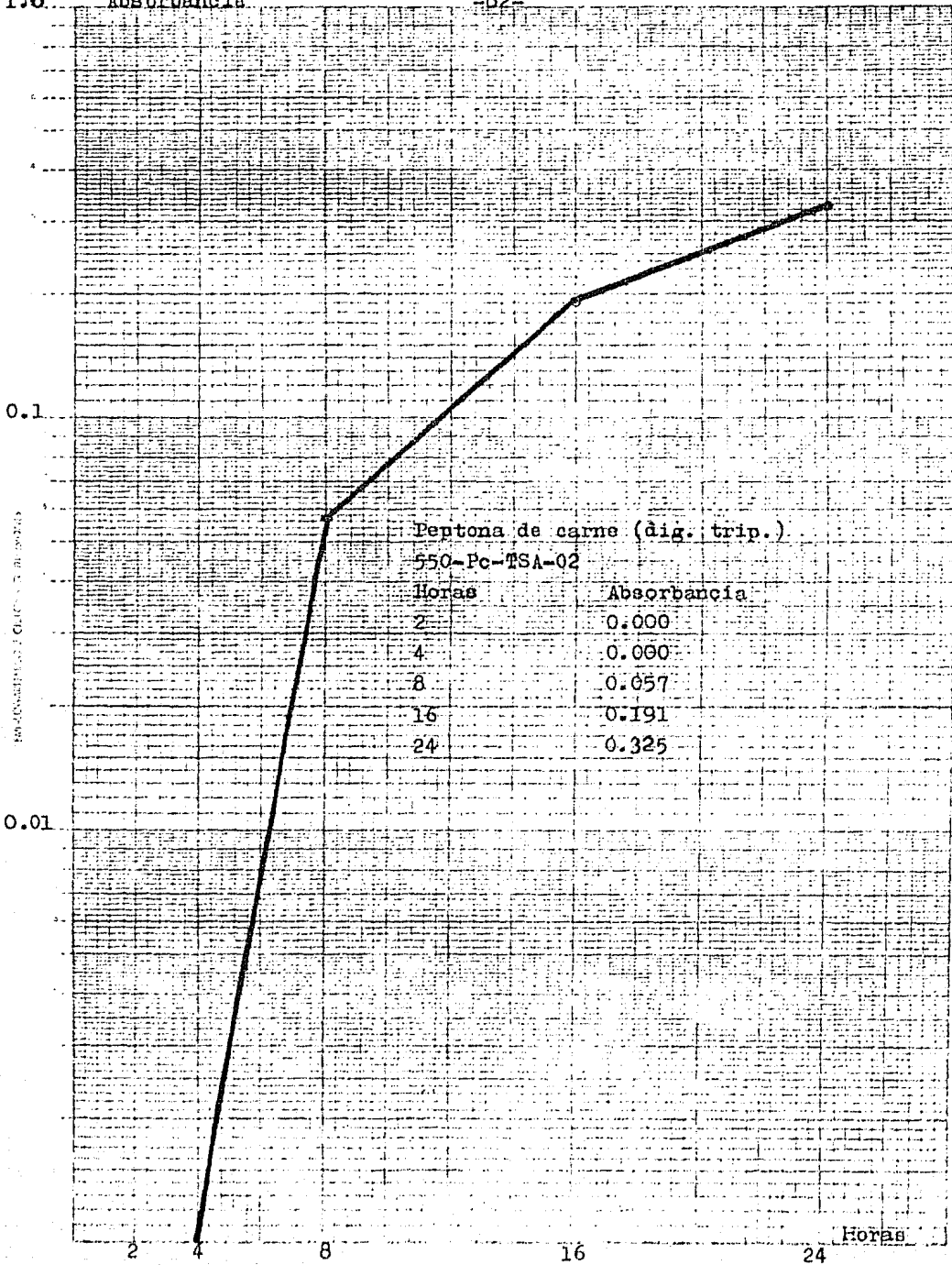
16 0.138

24 0.145

Horas

16

24



Peptona de carne (dig. trip.)

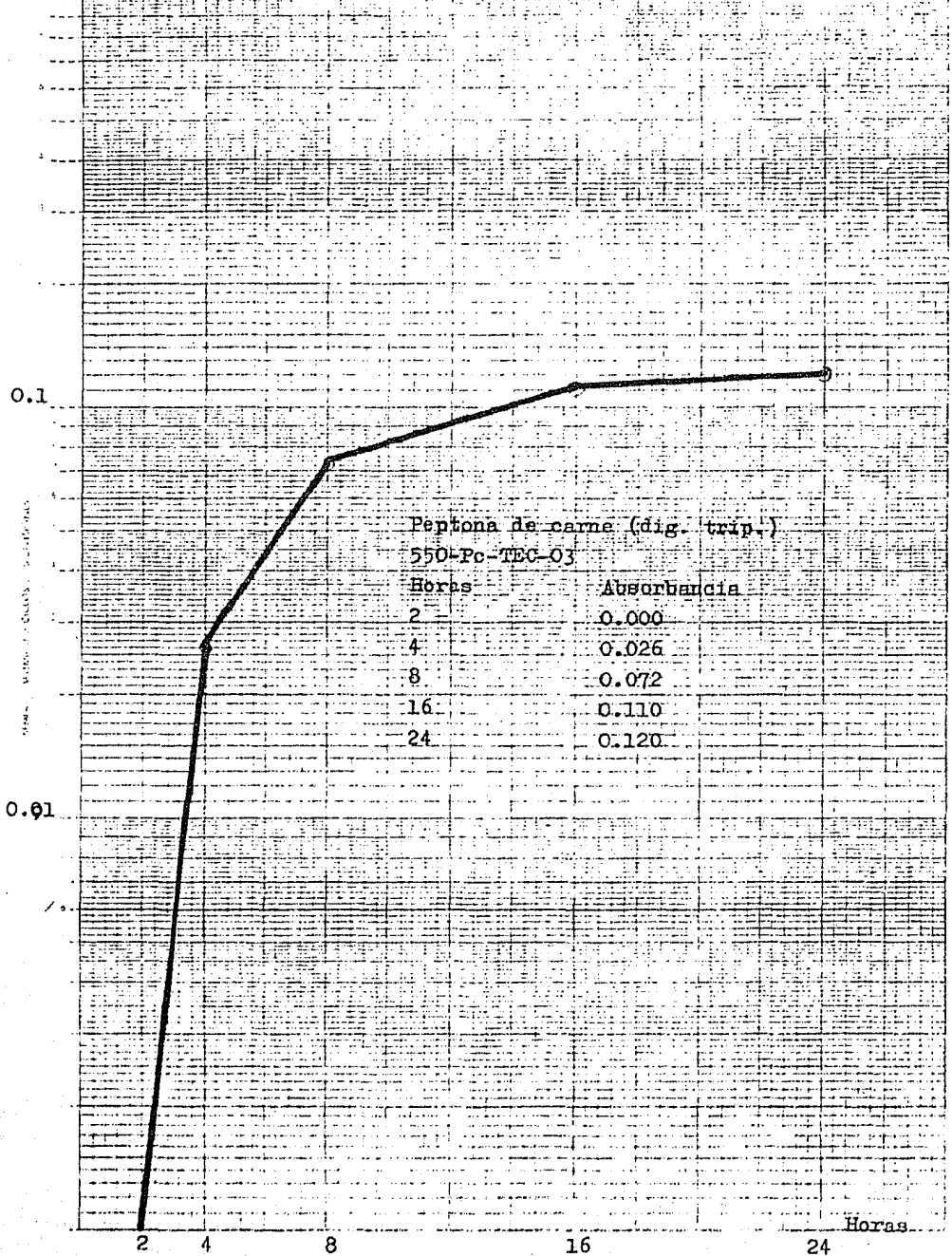
550-Pc-TSA-02

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.000
8	0.057
16	0.191
24	0.325

Horas

1.0 Absorbancia

-83-



Peptona de carne (dig. trip.)

550-Pc-TEC-03

Horas Absorbancia

2 0.000

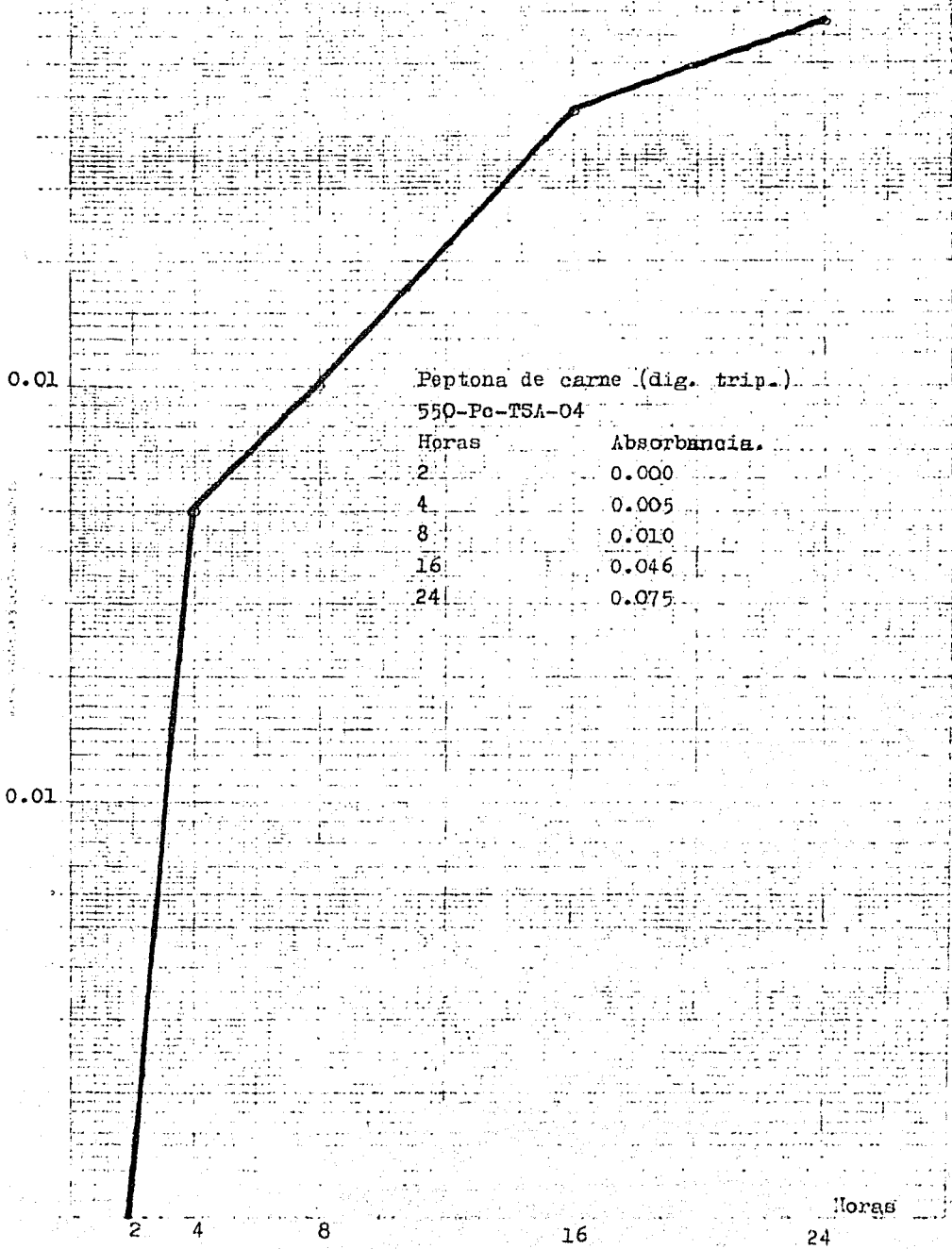
4 0.026

8 0.072

16 0.110

24 0.120

Horas



Peptona de carne (dig. trip.)

550-Pc-TSA-04

Horas

Absorbancia.

2

0.000

4

0.005

8

0.010

16

0.046

24

0.075

0.01

0.01

Horas

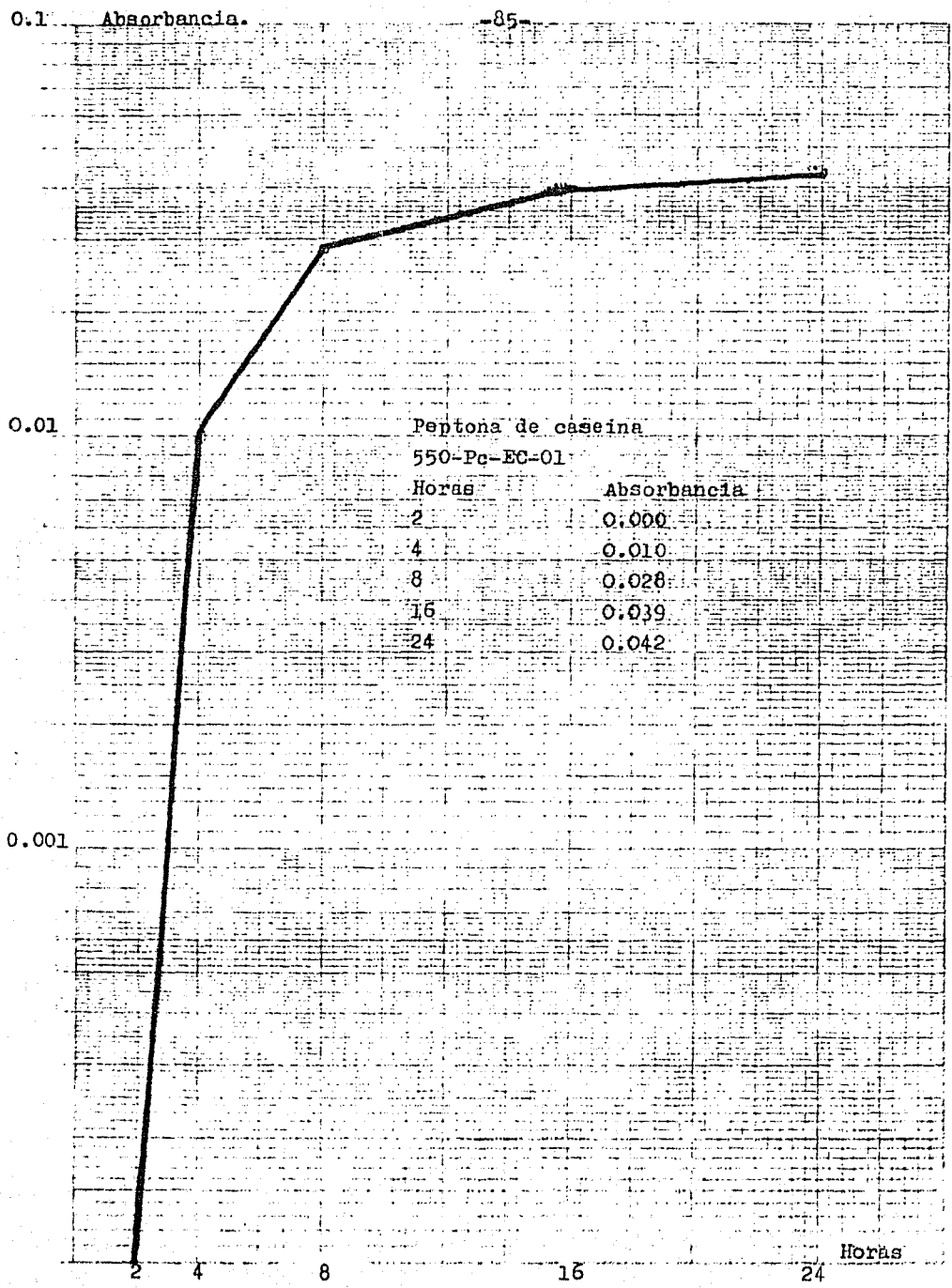
2

4

8

16

24

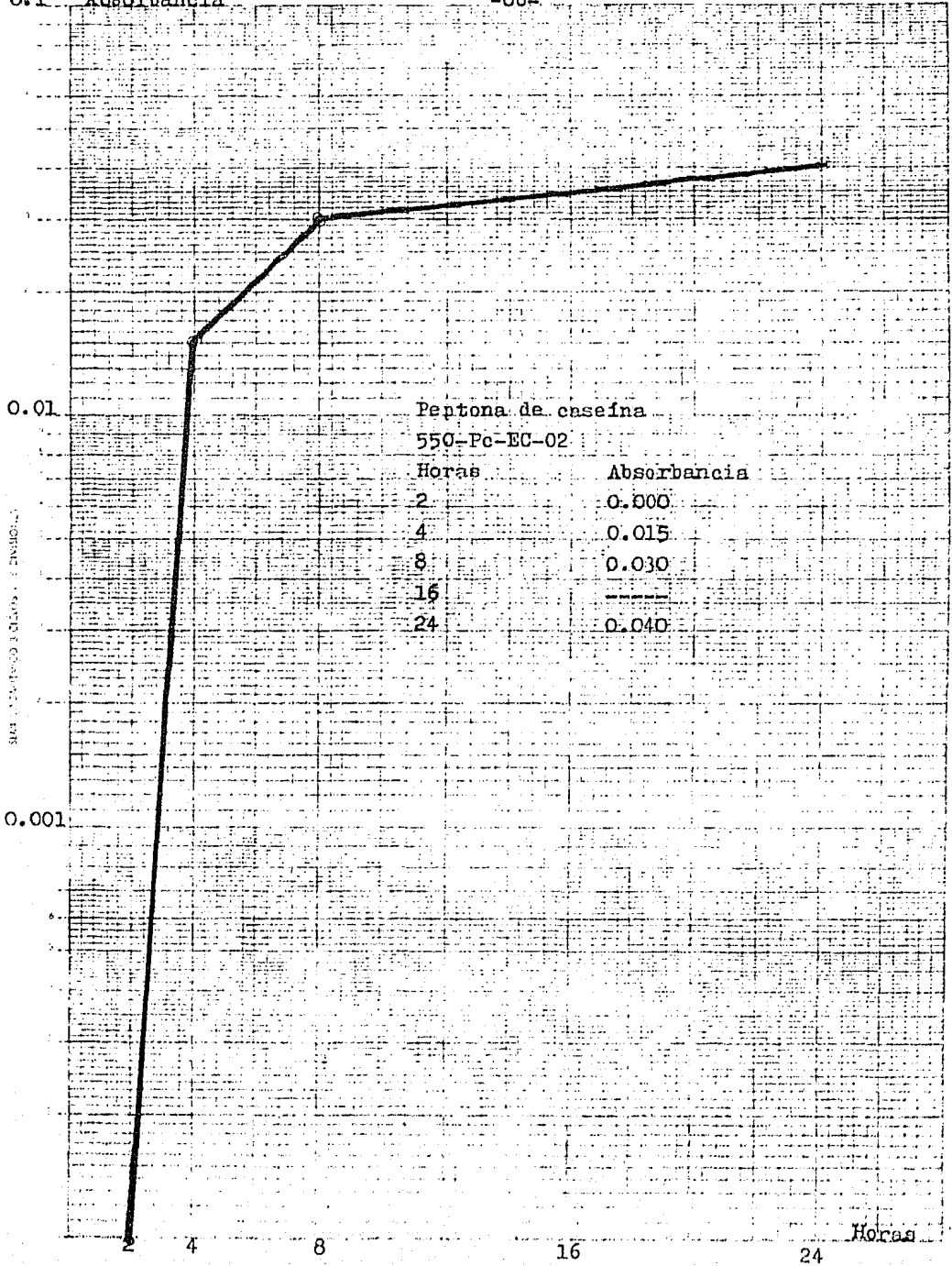


Peptona de caseina  
550-Pc-EC-01

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.010
8	0.028
16	0.039
24	0.042

Horas





0.1

Absorbancia

-87-

0.01

0.001

Peptona de caseina  
550-Pc-SA-03

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.000
8	0.023
16	0.033
24	0.046

2

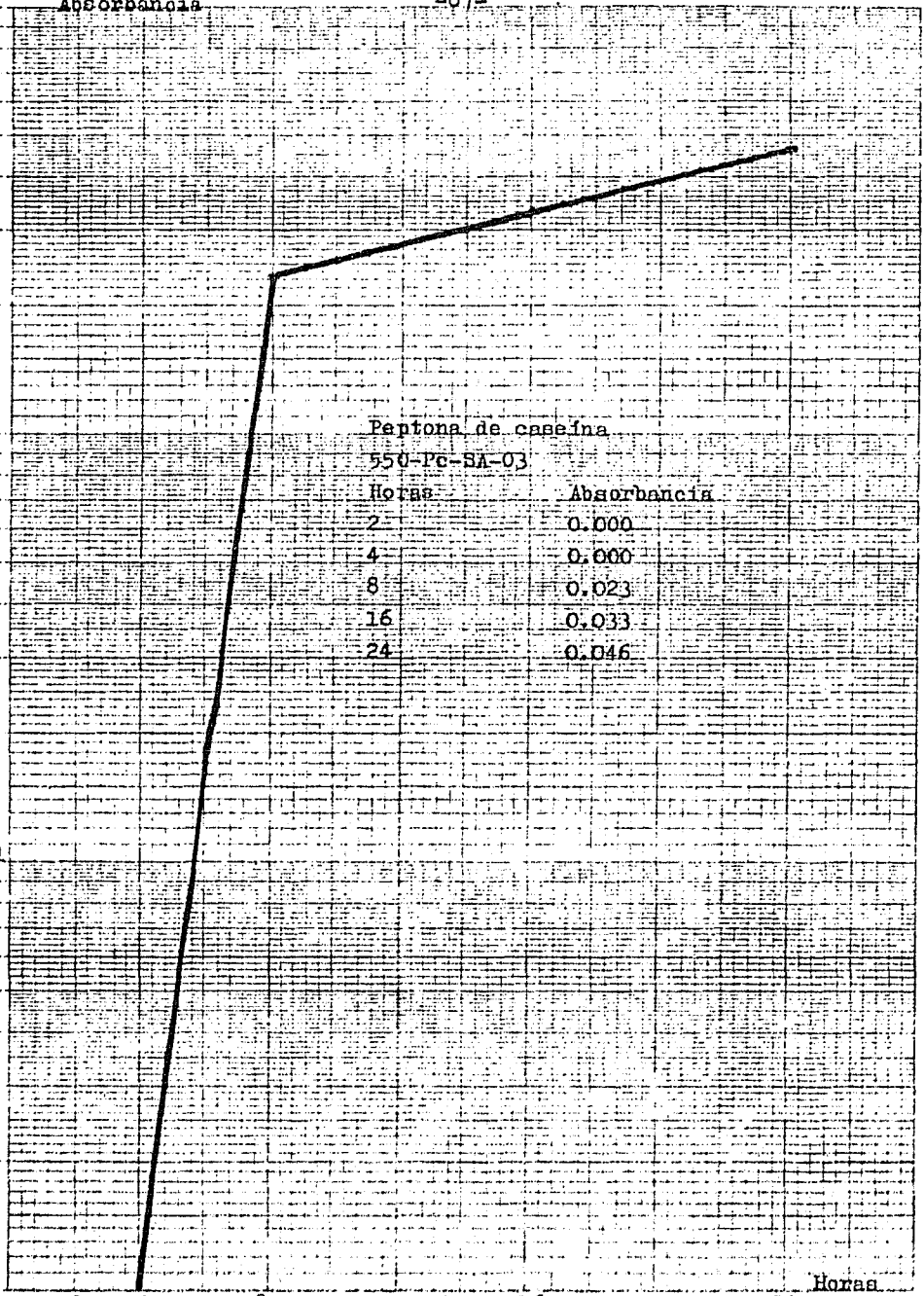
4

8

16

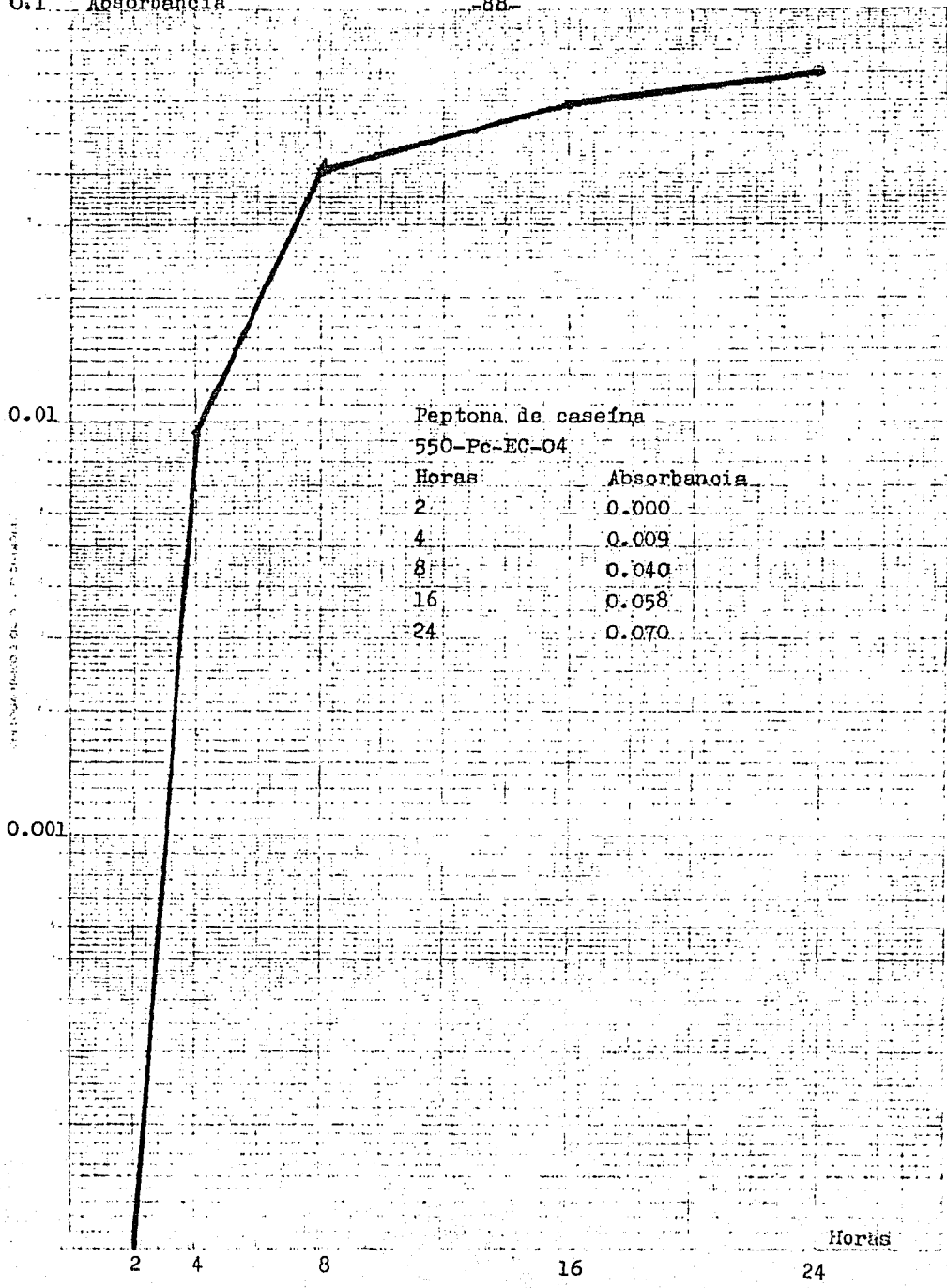
24

Horas



0.1 Absorbancia

-88-



Peptona de caseína

550-Pc-EC-04

Horas

Absorbancia

2

0.000

4

0.009

8

0.040

16

0.058

24

0.070

Horas

2

4

8

16

24

0.1

Absorbancia

-89-

0.01

0.001

Peptona de caseina  
550-Pc-SA-05

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.000
8	0.019
16	0.038
24	0.055

Horas

2

4

8

16

24

0.1

Absorbancia

-90-

0.01

Pentona de caseína

550-Pc-EC-06

Horas Absorbancia

2 0.000

4 0.008

8 0.042

16 0.050

24 0.064

0.001

LABORATORIO DE QUÍMICA E FÍSICA - UNICAMP

2

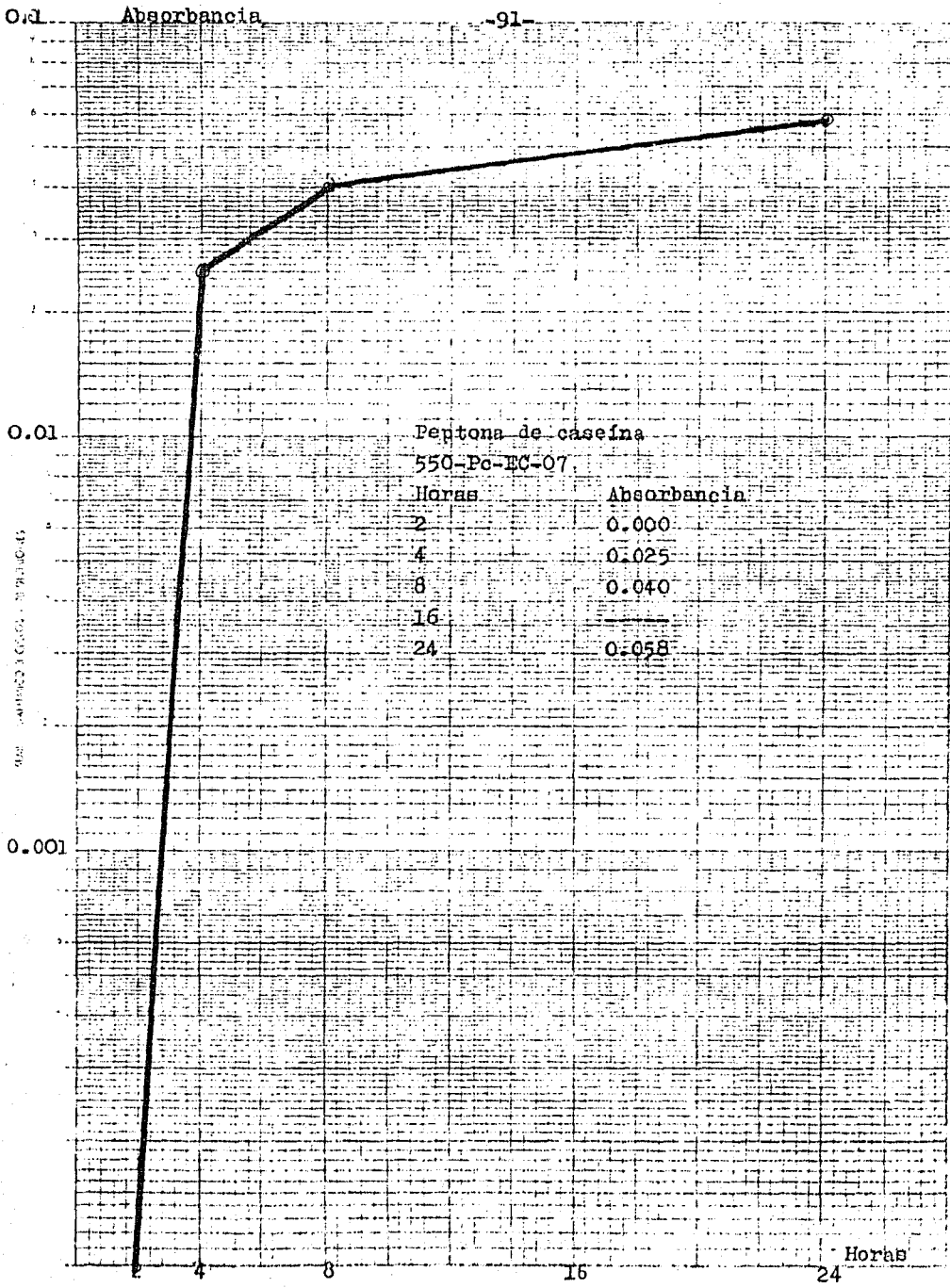
4

8

16

24

Horas



0.1

Absorbancia

-92-

0.01

0.001

Protona de caseína

550-Pc-EC-08

Horas

Absorbancia

2

0.000

4

0.019

8

0.040

16

24

0.060

2

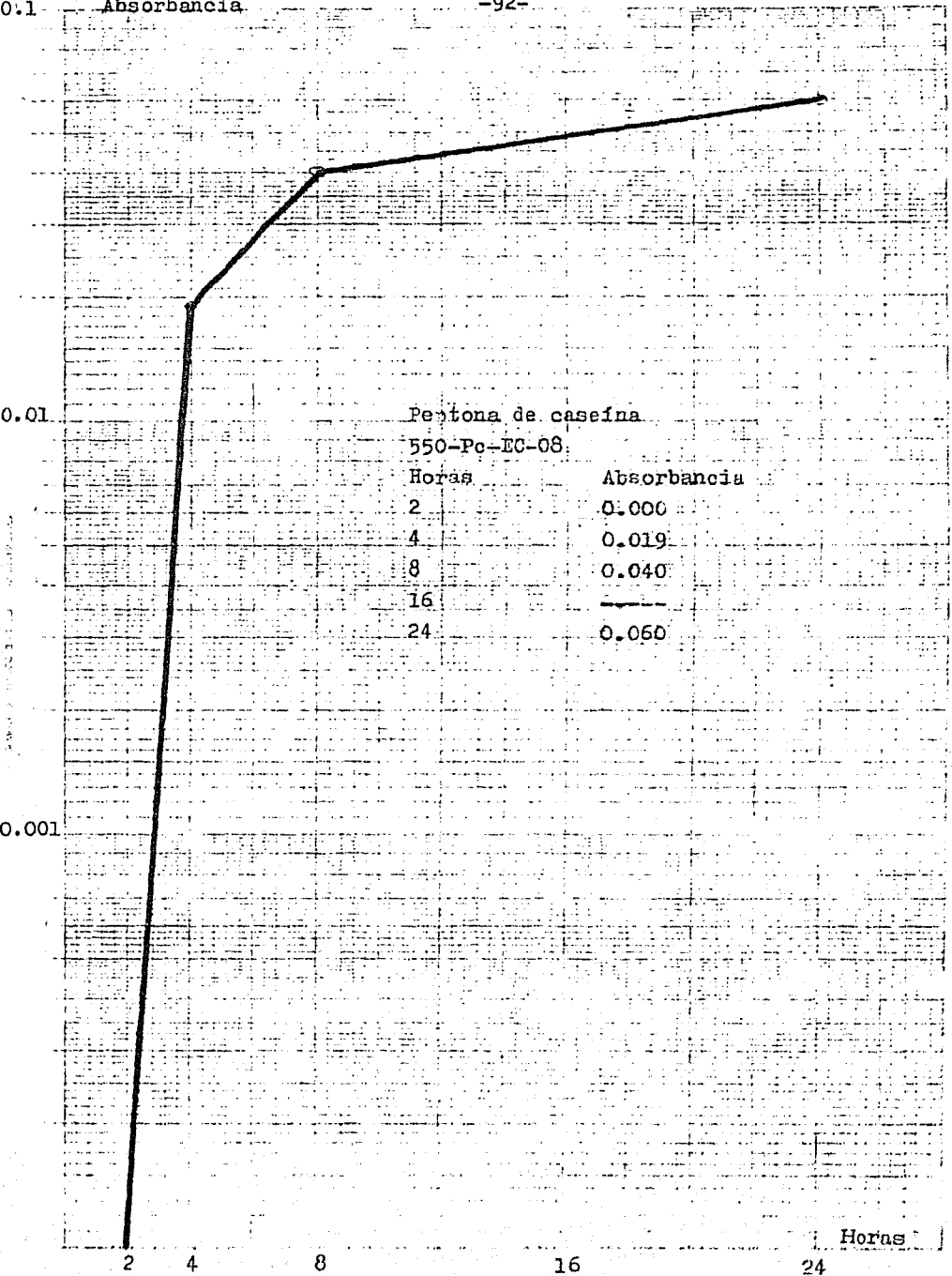
4

8

16

24

Horas



0.1

Absorbancia

-93-

0.01

0.001

Peptona de caseina  
550-Pb-SA-09

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.000
8	0.012
16	0.026
24	0.038

2

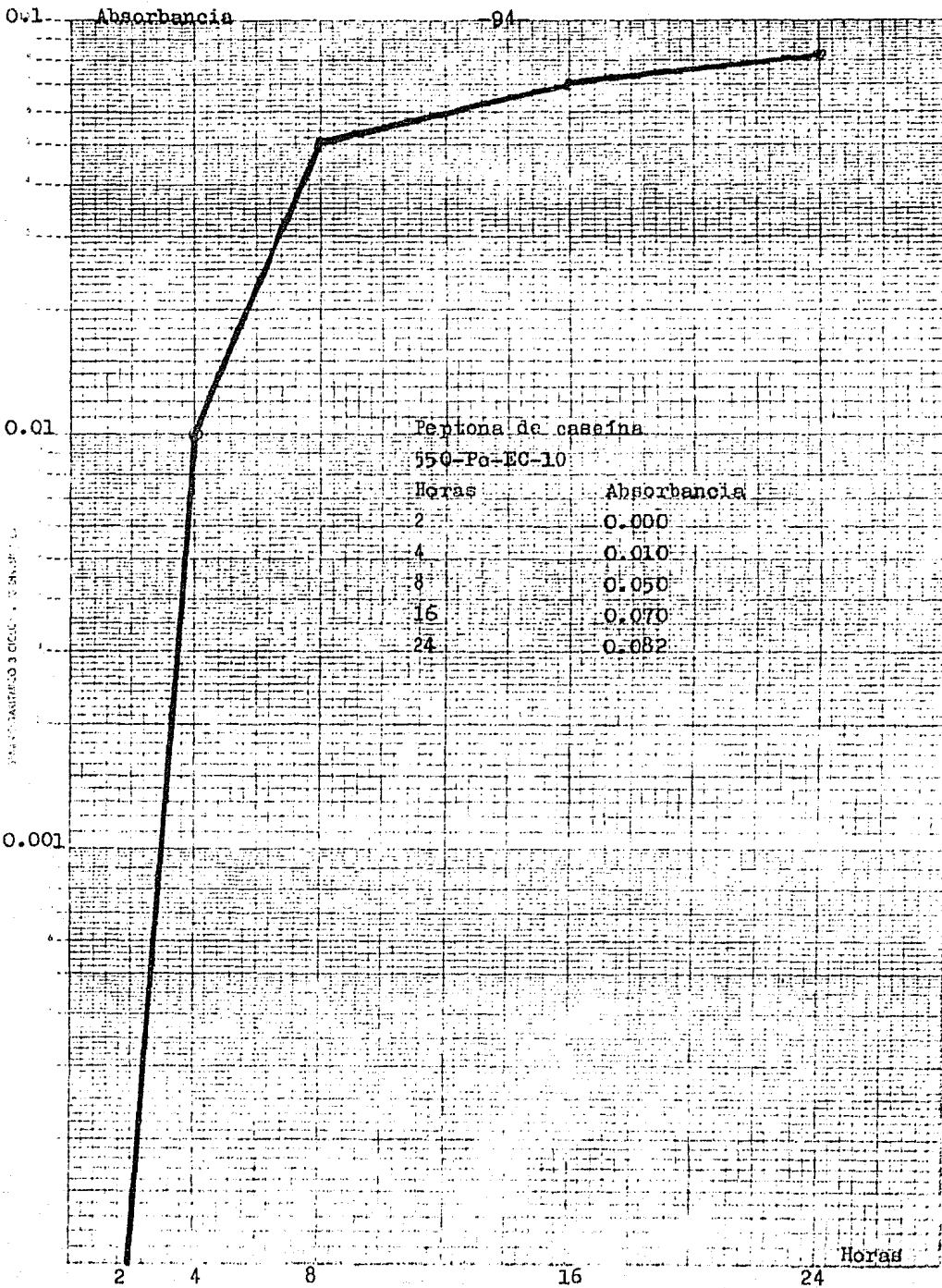
8

16

24

Horas





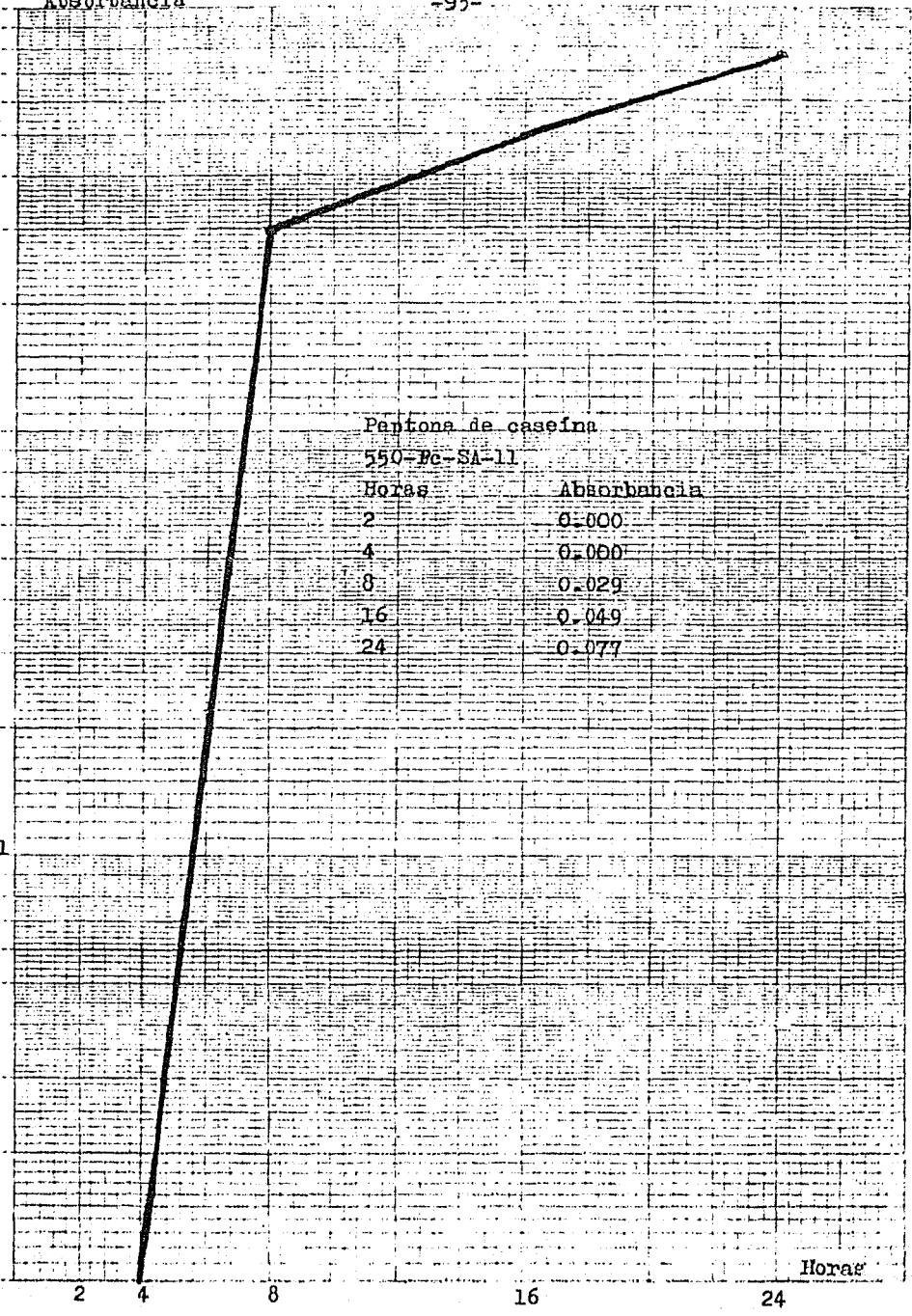
550-Pa-EC-10 3 CC/CC - 0.5% (p/v)

0.01

0.001

Peptona de caseina  
550-Pc-SA-11

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.000
8	0.029
16	0.049
24	0.077



Horas

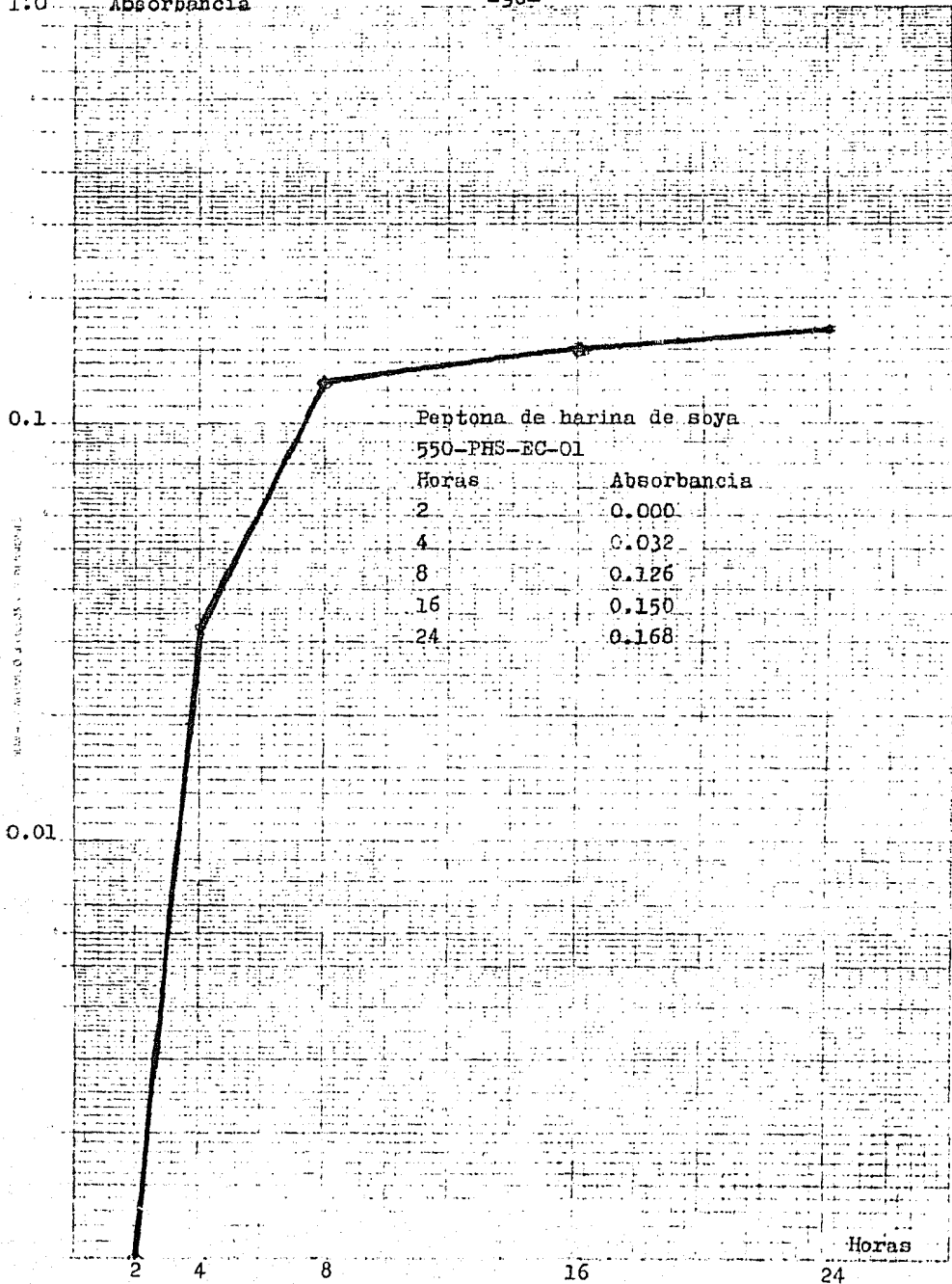
2

4

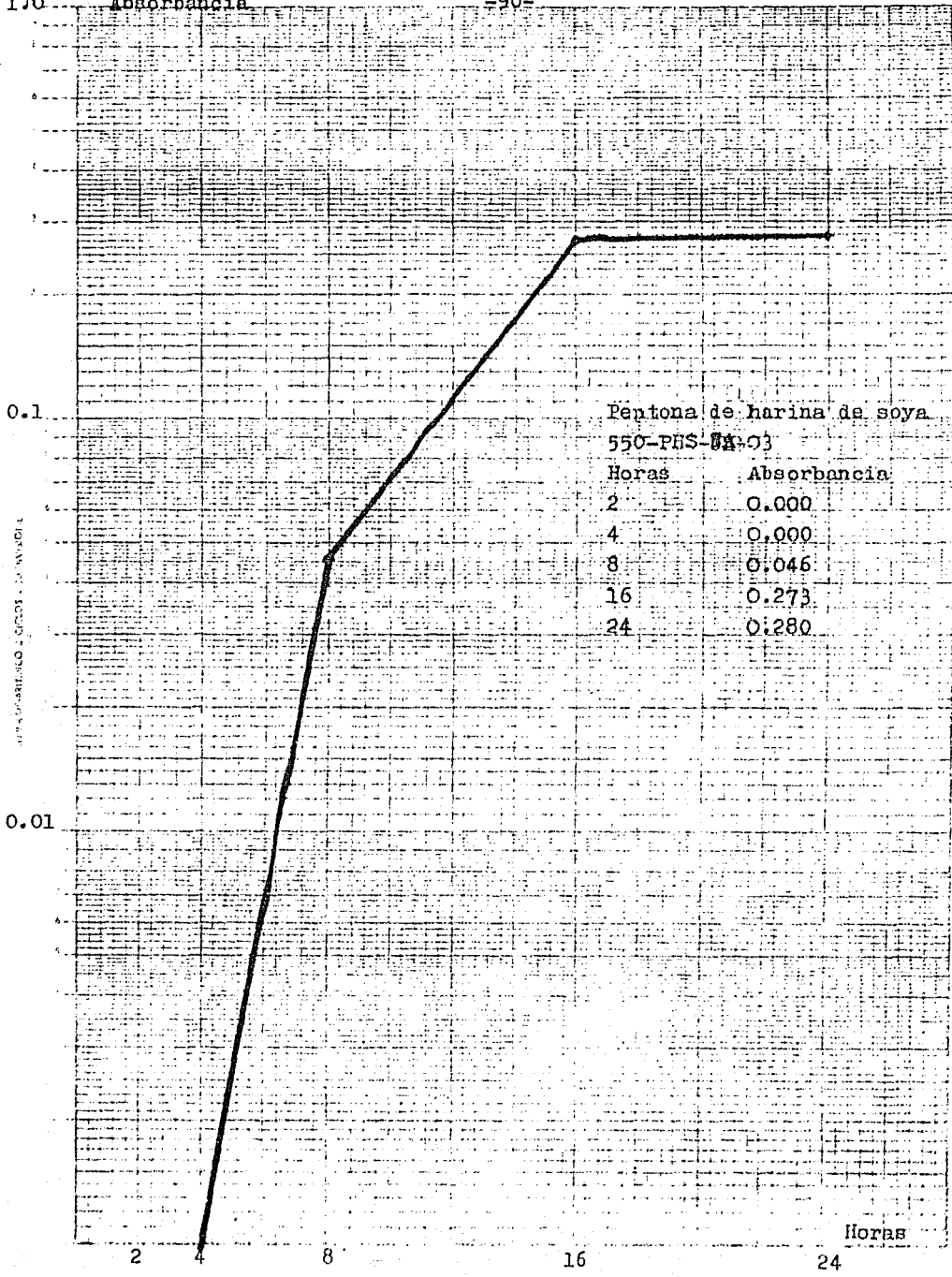
8

16

24



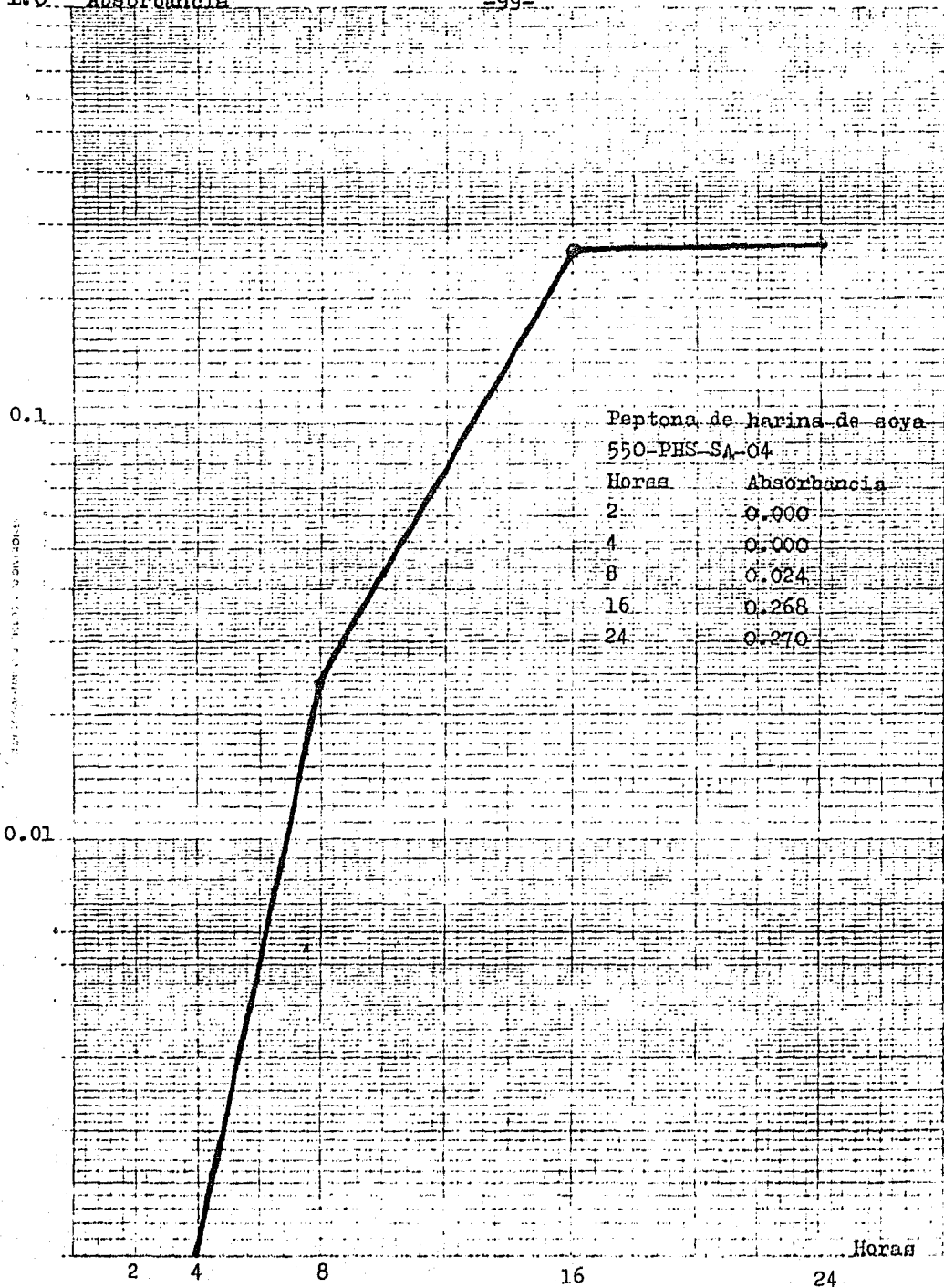




Pentona de harina de soya  
550-PES-11-03

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.000
8	0.046
16	0.273
24	0.280

Horas



1.0

Absorbancia

-100-

0.1

0.01

Proteína de harina de soya  
550-PHS-EC-05

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.030
8	0.095
16	0.126
24	0.130

Horas

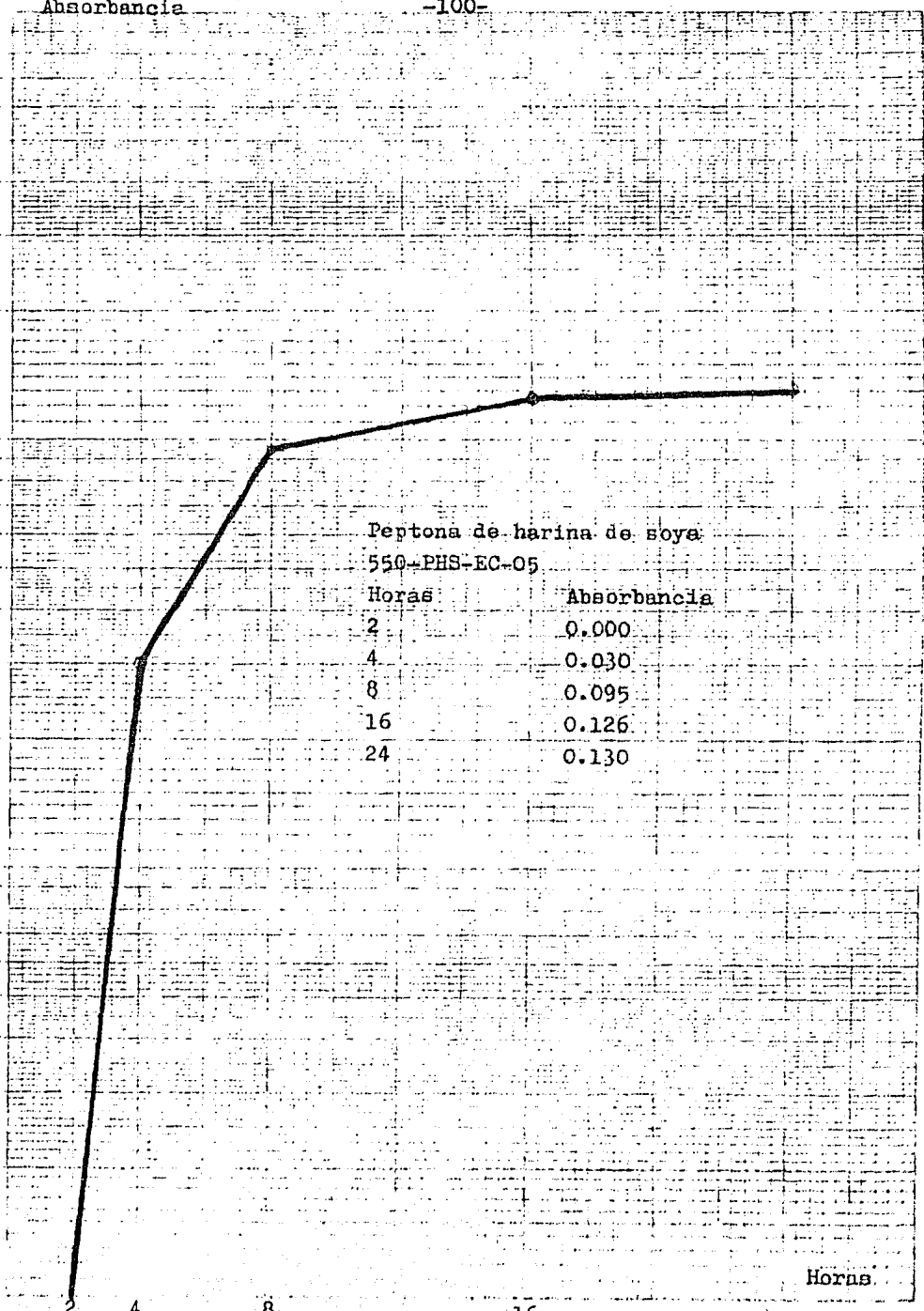
2

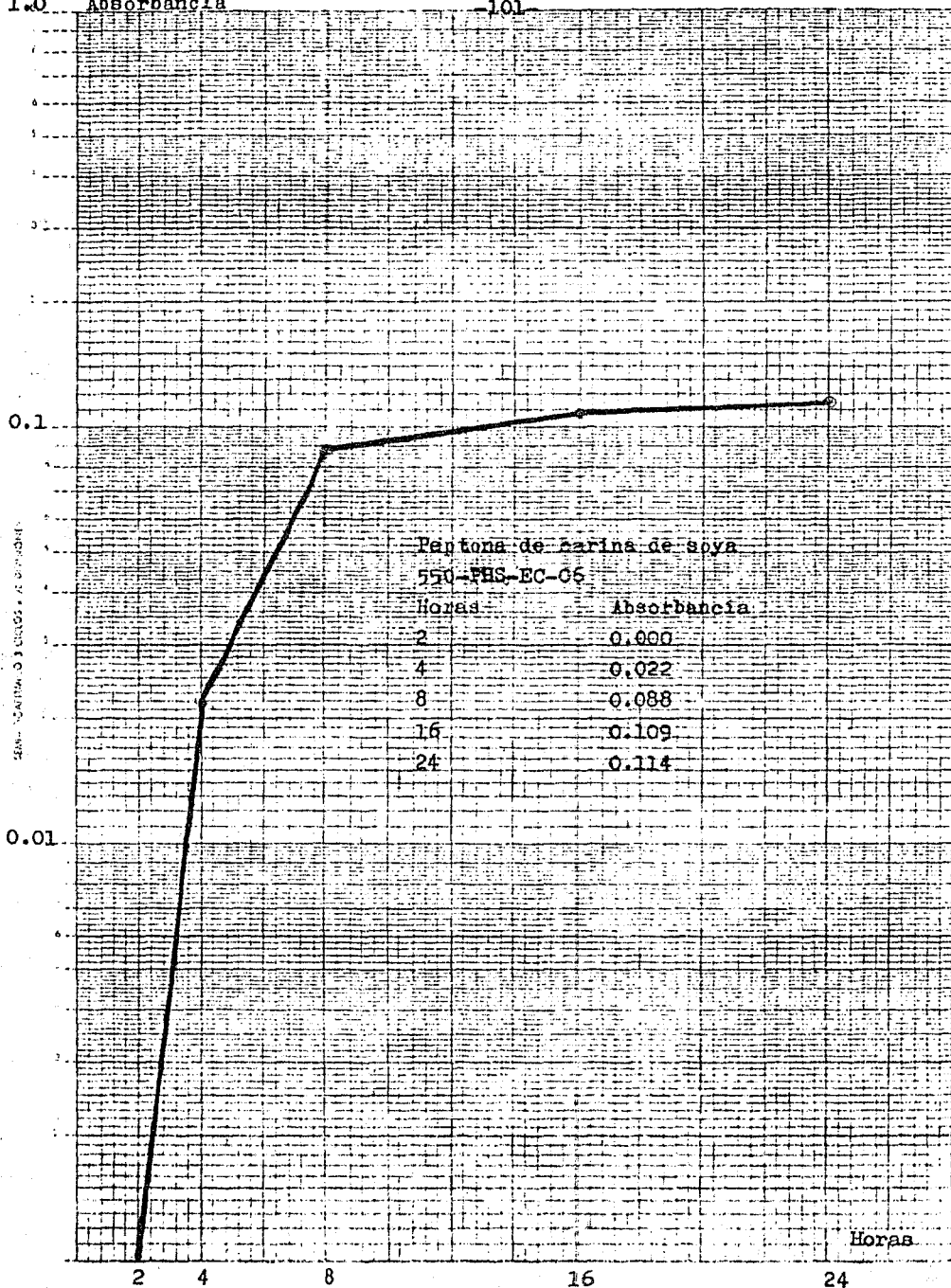
4

8

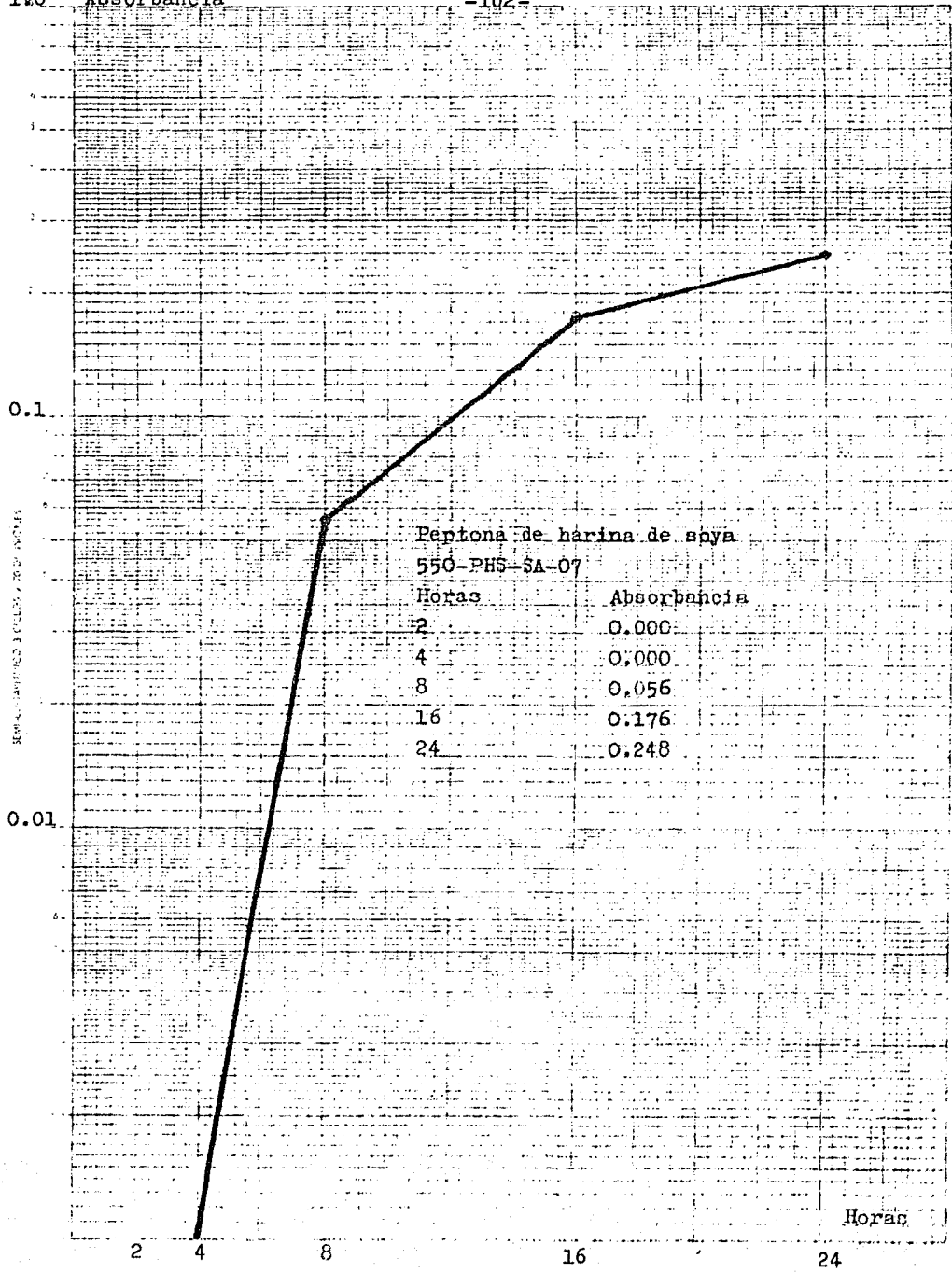
16

24









Peptona de harina de soya  
550-PHS-SA-07

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.000
8	0.056
16	0.176
24	0.248

Horas

0.1 Absorbancia

-103-

0.01

0.001

Leptona de harina de soya  
550-PHS-SA-08

Horas:	Absorbancia:
2	0.000
4	0.007
8	0.014
16	0.050
24	0.075

Horas

2

4

8

16

24

0.1 Absorbancia

-104-

0.01

0.001

Peptona de gelatina  
550-PG-EC-01

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.010
8	0.030
16	0.038
24	0.045

2

4

8

16

24

Horas

0.1  
0.01  
0.001

0.1

Absorbancia

-105-

0.01

0.001

Pentona de gelatina  
550-PG-EC-02

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.030
8	0.035
16	0.044
24	0.054

Horas

2 4 8 16 24

Pentona de gelatina 550-PG-EC-02

0.1

Absorbancia

-106-

0.01

0.001

Peptona de gelatina

550-PG-SA-03

Horas

Absorbancia

2

0.000

4

0.005

8

0.005

16

0.021

24

0.025

Horas

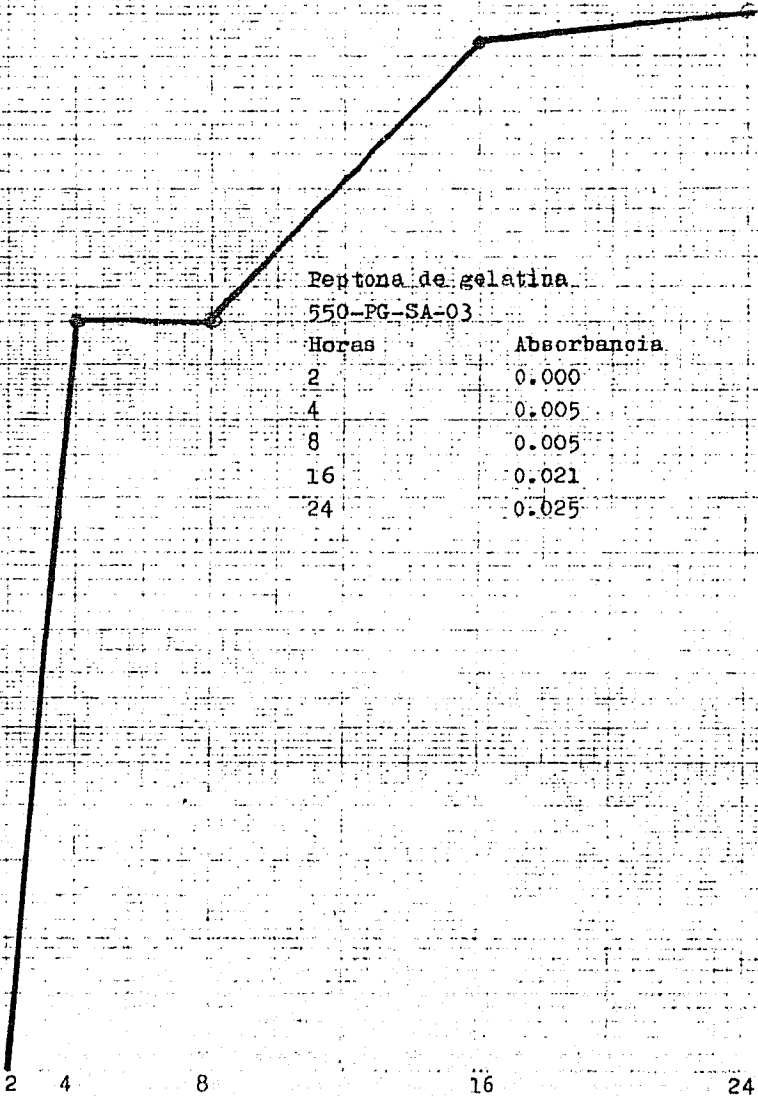
2

4

8

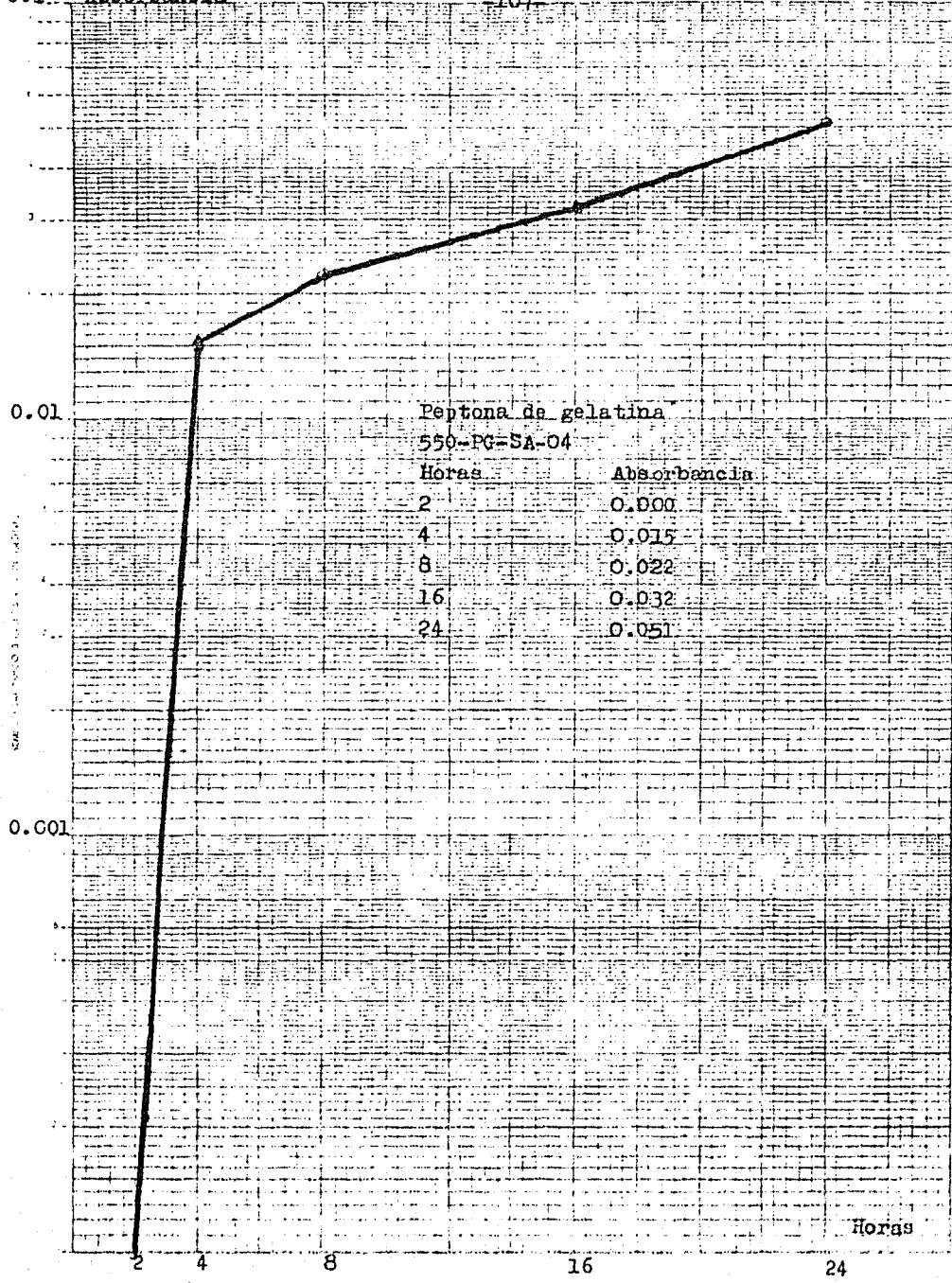
16

24



0.1. Absorbancia

-107-



Peptona de gelatina  
550-PG-SA-04

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.015
8	0.022
16	0.032
24	0.051

Horas

0.1 Absorbância

-108-

0.01

Peptona de gelatina

550-PG-EC-05

Horas

Absorbancia

2

0.000

4

0.005

8

0.020

16

0.028

24

0.033

0.001

Horas

2

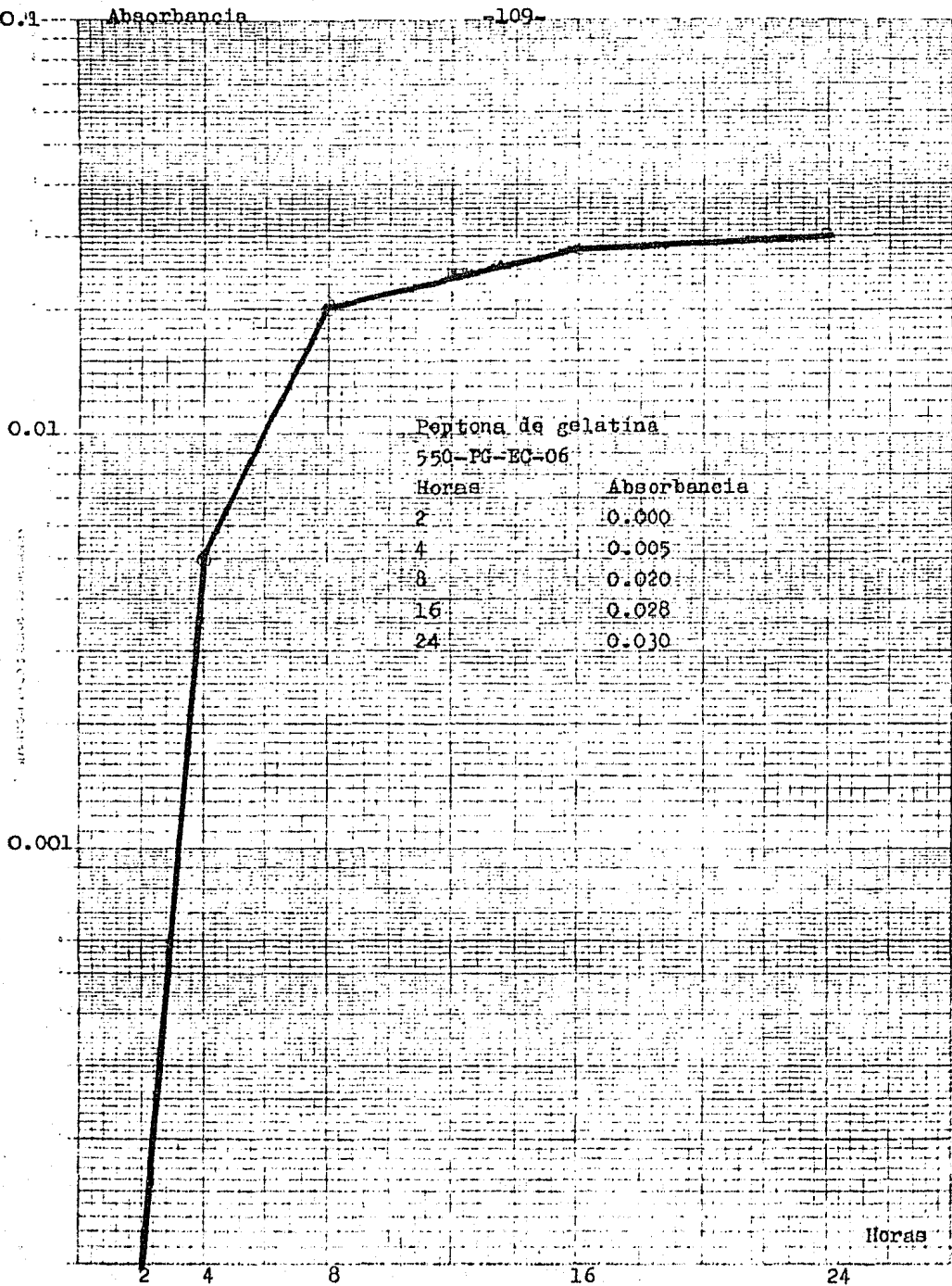
4

8

16

24

0.0001



Peptona de gelatina

550-PG-EC-06

Horas Absorbancia

2 0.000

4 0.005

8 0.020

16 0.028

24 0.030

Horas



0.1 Absorbancia

-110-

0.01

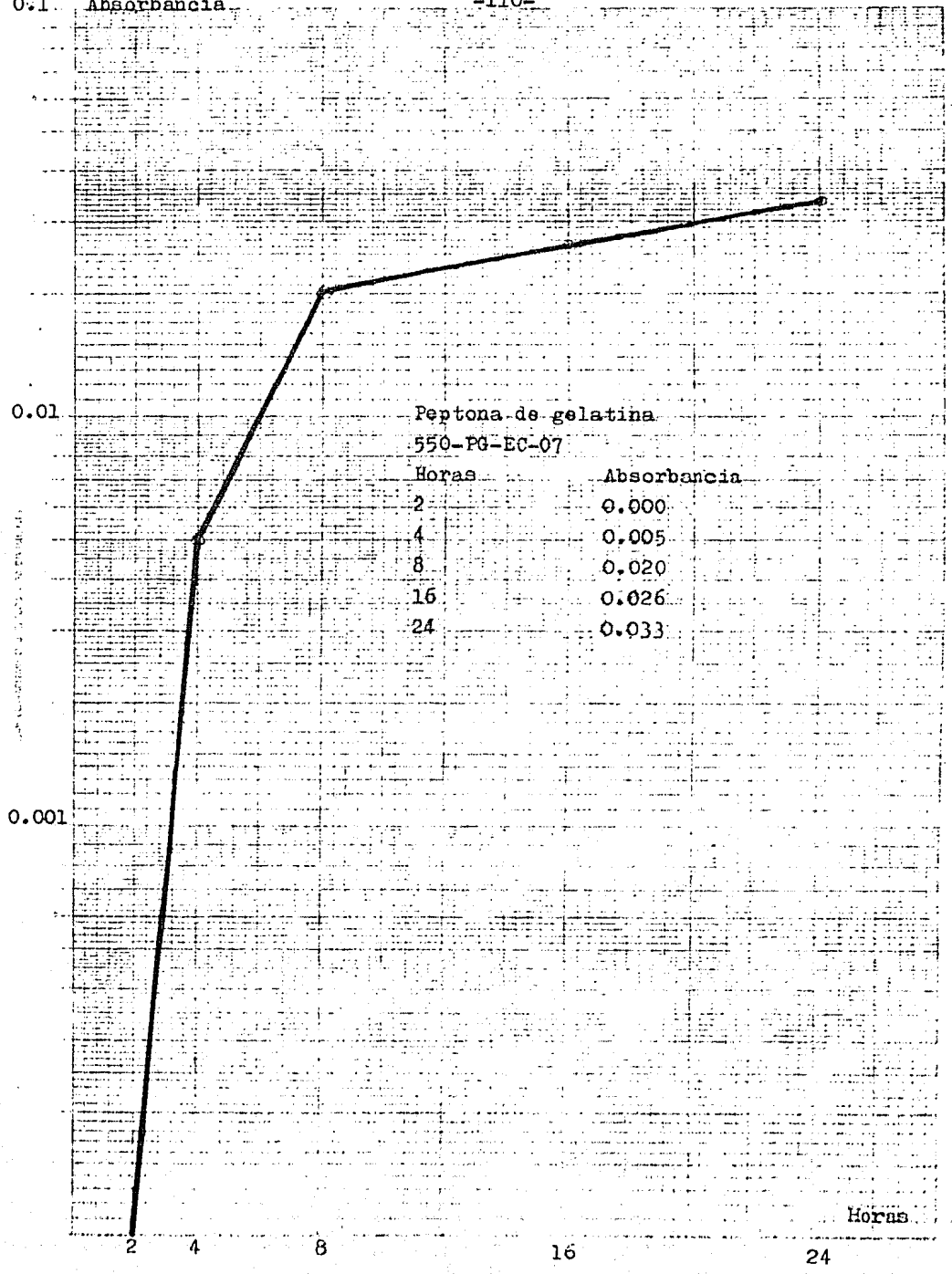
0.001

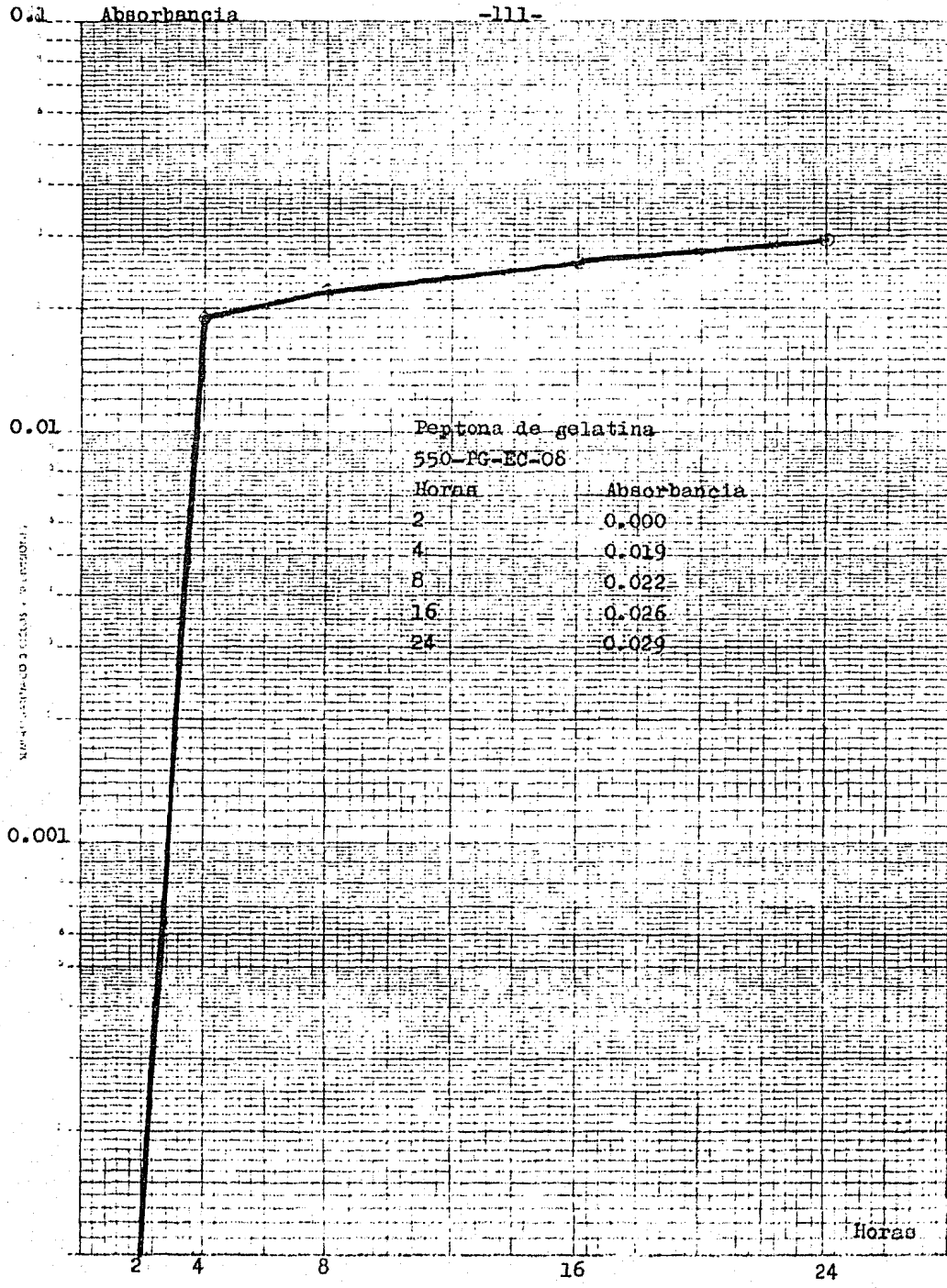
Peptona de gelatina  
550-PG-EC-07

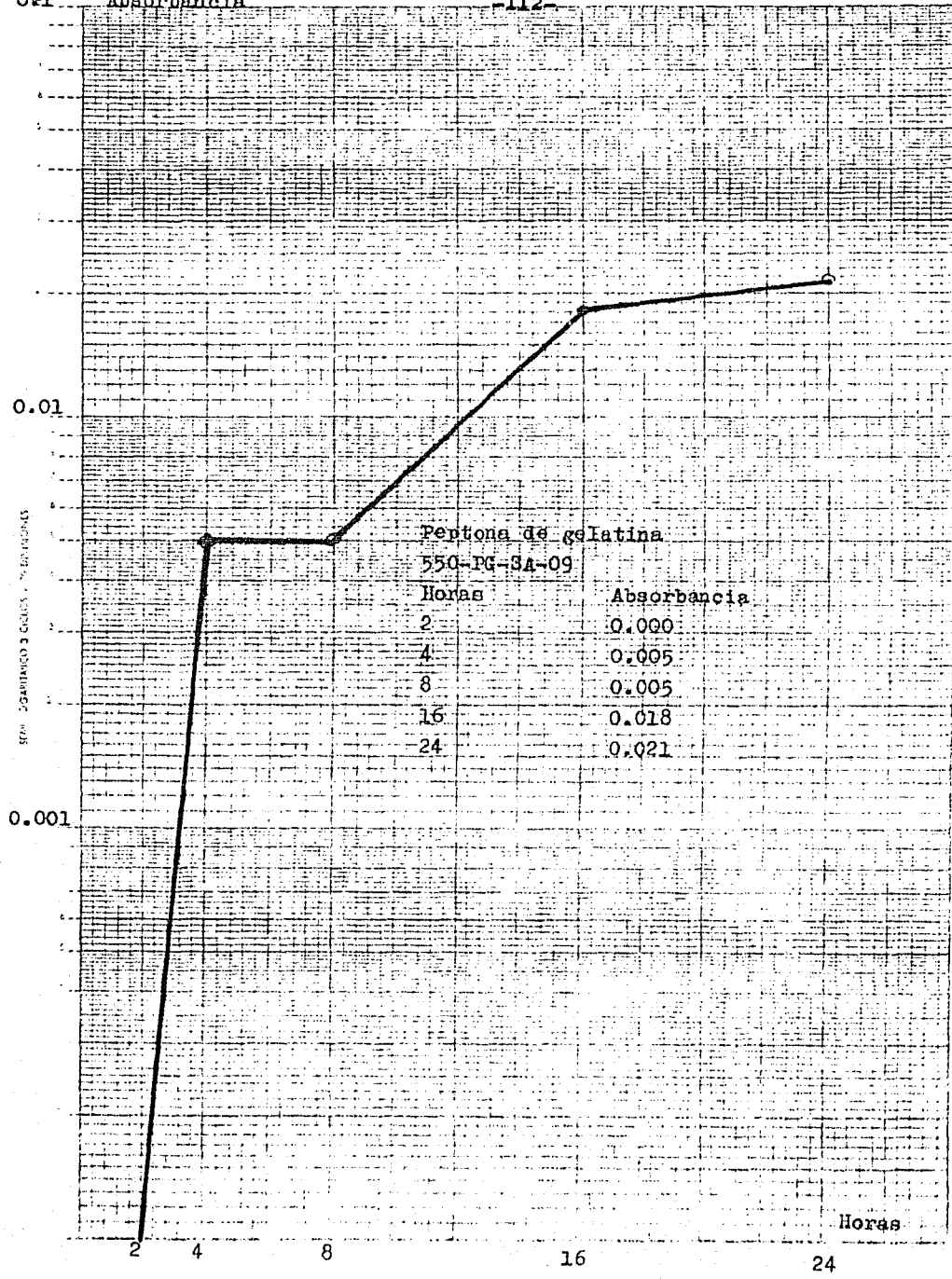
Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.005
8	0.020
16	0.026
24	0.033

Horas

2 4 8 16 24







Peptona de gelatina  
550-PG-SA-09

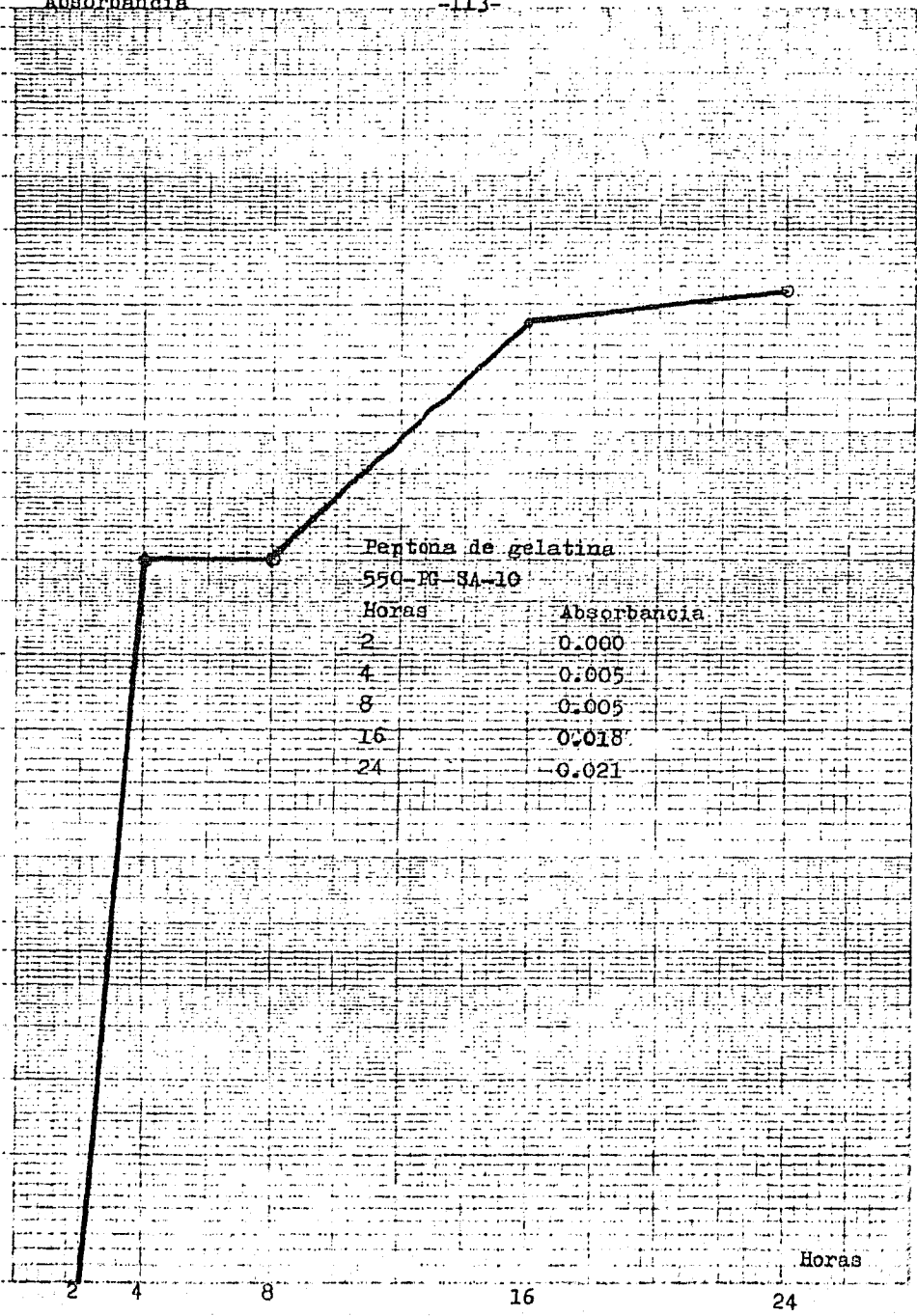
Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.005
8	0.005
16	0.018
24	0.021

Horas

0.01

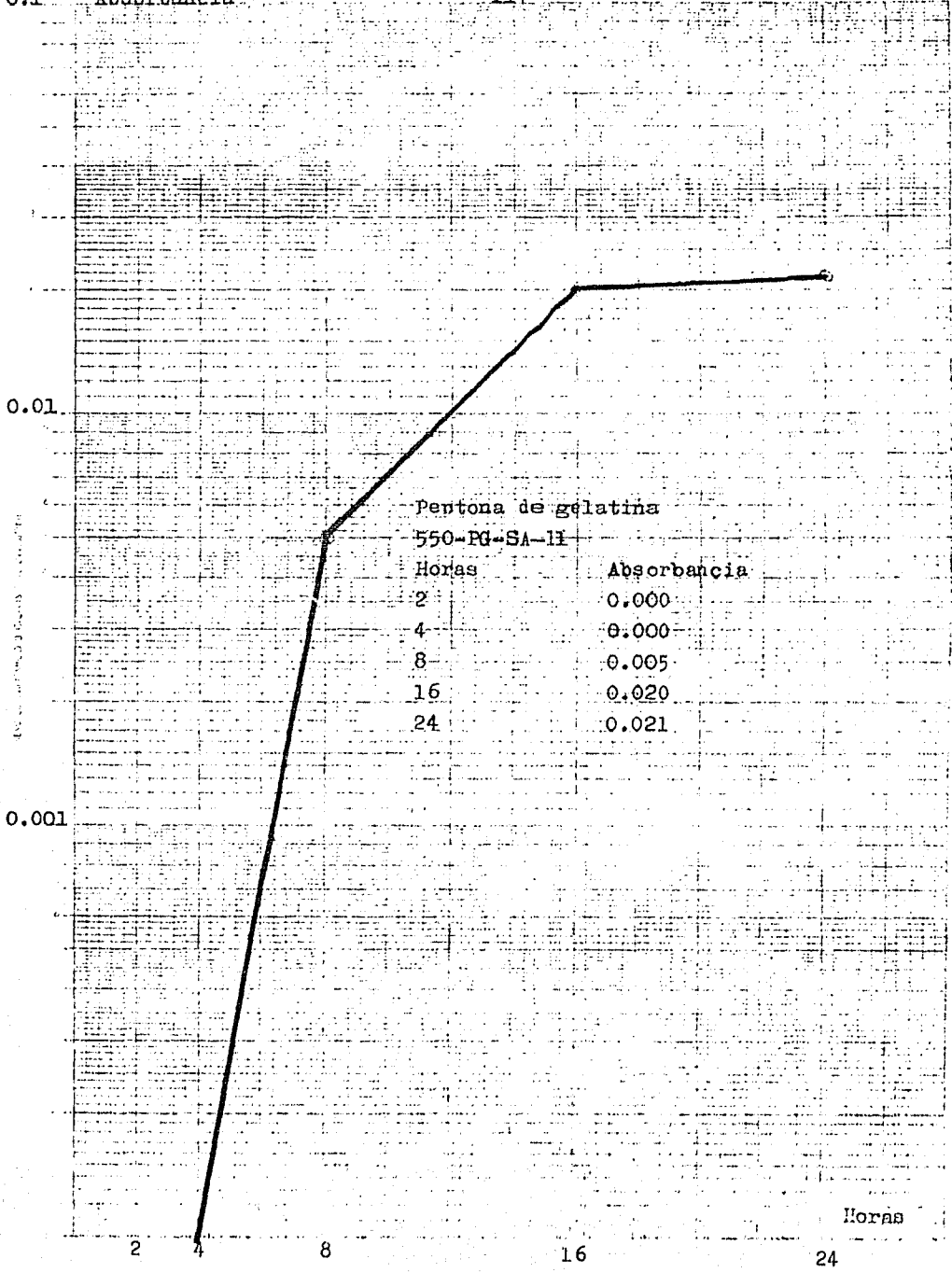
M. J. ...

Pentona de gelatina	
550-PG-84-10	
Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.005
8	0.005
16	0.018
24	0.021



Horas

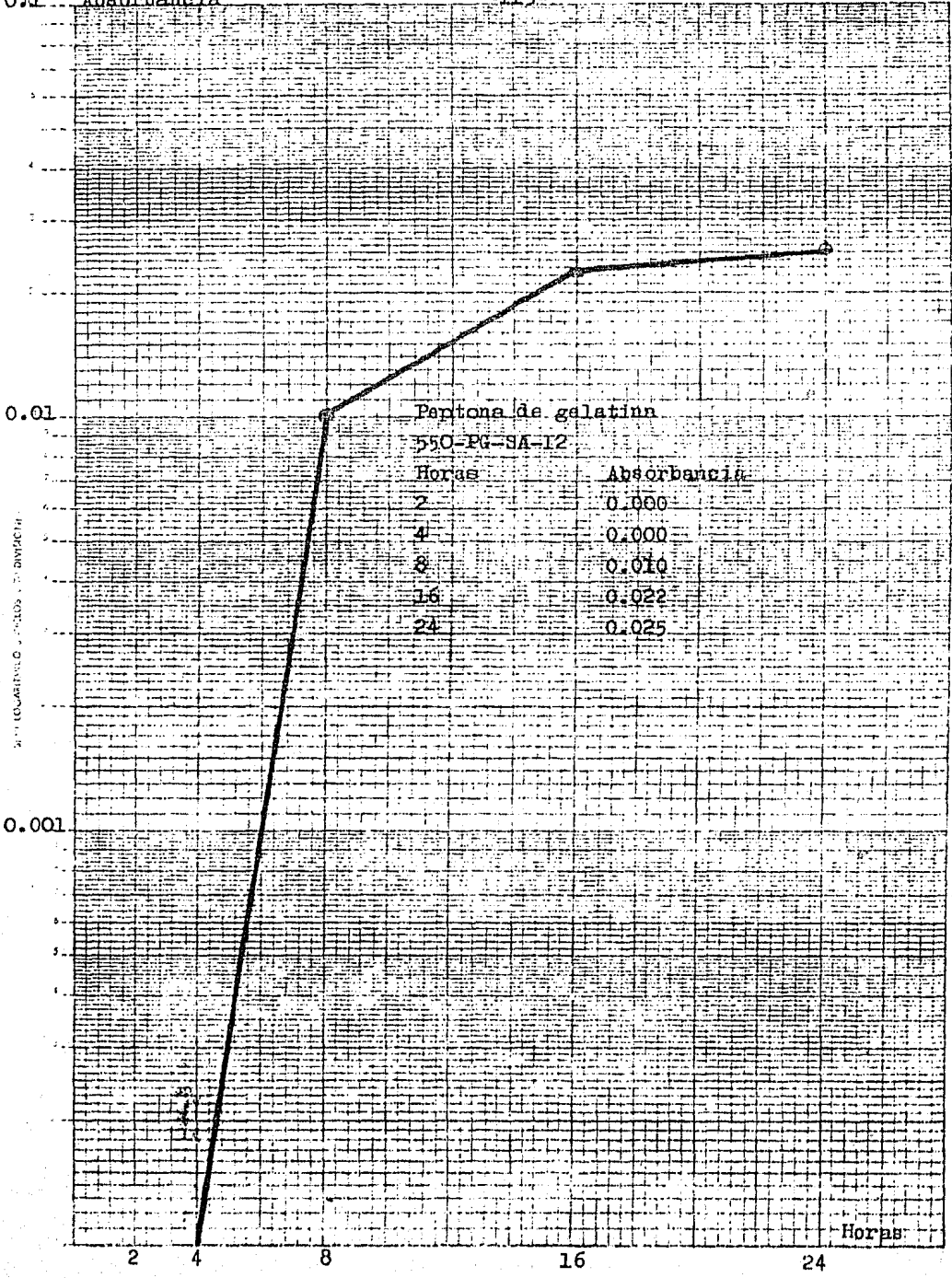
2 4 8 16 24



Pentona de gelatina  
550-PG-SA-II

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.000
8	0.005
16	0.020
24	0.021

Horas



Peptona de gelatina  
550-PG-SA-12

Horas	Absorbancia
2	0.000
4	0.000
8	0.010
16	0.022
24	0.025

Horas

## 5.0.0 DISCUSIONES.

En este estudio se escogieron aquellas materias primas que son las principales fuentes de nitrógeno en la formulación de medios de cultivo de enriquecimiento (como agar casoy) y medios selectivos (como agar cetrimide para aislamiento de Pseudomonas).

Del conjunto general de muestras se obtuvieron siete grupos, dos de extractos y cinco de peptonas, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera:

### 1.- EXTRACTO DE LEVADURA.

La muestra que más se aproxima al testigo 550-El-EC-01, fue el problema 550-El-EC-C5. En estas gráficas se puede apreciar una pendiente similar, lo que nos puede dar una idea del comportamiento de los extractos incorporados a un medio de cultivo.

Las muestras 550-El-EC-07 y 550-El-EC09 presentan el mismo caso que los extractos anteriores con la diferencia que la fase logarítmica se presenta en un intervalo de tiempo más largo. Por lo que se puede hacer una apreciación cualitativa del tiempo de generación, siendo este tiempo más largo. En estas muestras al no poder comparar con ninguno de los testigos habría que observar su comportamiento al incorporarse en un medio de cultivo.

Con respecto a la gráfica 550-El-EC-03, no es comparable con los testigos observándose una fase logarítmica prolongada. Posiblemente para un mayor número de muestras se podrían encontrar más de un resultado similar al obtenido siempre y cuando se mantengan las mismas condiciones. Con respecto a la gra

rica 550-EI-EC-06, se necesita más información para la interpretación de los datos obtenidos.

Para S. aureus la fase de adaptación es generalmente detectada de 4 a 8 horas.

La muestra testigo 550-EI-SA-02, presenta una curva que para su interpretación es necesario más información como el contenido de metales pesados, contenido total de nitrógeno, contenido de nitrógeno en forma de aminoácidos, concentración de microorganismos inoculados y concentración de productos de desecho. Todo esto debe ser tomado en cuenta siempre y cuando se presente una curva como la obtenida.

Las muestras 550-EI-SA-03, 550-EI-SA-08, 550-EI-SA-10, presentan un comportamiento similar al testigo 550-EI-SA-04, observándose una fase logarítmica comprendida entre 4 y 8 horas. Debido a lo anterior se recomienda para futuras investigaciones tomar un mayor número de lecturas para este microorganismo en un lapso comprendido entre 6 y 10 horas.

## 2.- EXTRACTO DE CARNE.

Las curvas referentes a los problemas y los testigos para E. coli, son muy similares teniendo una fase logarítmica entre 2 y 4 horas, con una fase estacionaria muy cercana a 0.1 unidades de absorbancia. Para S. aureus, la fase de adaptación se encuentra entre 2 y 4 horas, con una fase estacionaria muy cercana a 0.1 de absorbancia al igual que para E. coli.

## 3.- PEPTONA DE CARNE (DIF. ÓPTICA).

El testigo para E. coli, 550-Pc-PEC-01, se puede tomar como parámetro de comparación cualitativa. Para los problemas 550-Pc-PEC-04, 550-Pc-PEC-05, 550-Pc-PEC-02.



Para S. aureus, el problema 550-Pc-PSA-06, es similar con el testigo 550-Pc-PSA-03, presentando una fase de adaptación de 0 a 2 horas, una fase logarítmica comprendida entre 2 y 4 horas y una fase de adaptación de 16 y 24 horas.

Para la muestra 550-Pc-PSA-07, el crecimiento en su fase de adaptación fue reprimido pero se recuperó en un lapso de 4 a 16 horas, por lo que se espera que esta materia prima al ser incorporada a algún medio de cultivo se tenga que enriquecer con alguna materia prima que tenga un alto contenido de nitrógeno utilizable.

#### 4.- PEPTONA DE CARNE (DIG. TRITICA).

Para E. coli, la grafica 550-Pc-TEC-03 es similar a su testigo 550-Pc-TEC-01, dando una curva cuya fase de adaptación se encuentra entre 0 y 2 horas, su fase logarítmica entre 2 y 4 horas, su fase estacionaria entre 8 y 24 horas. Teniendo lecturas menores de 0.2 unidades de absorbancia y mayores de 0.1 unidades de absorbancia para la fase estacionaria.

Para S. aureus, tenemos que la curva 550-Pc-TSA-04, es idéntica a su testigo 550-Pc-TSA-02, pero con un valor de 10 veces menor. Esta gráfica nos puede dar una idea del comportamiento del microorganismo en una materia prima con bajo contenido de nitrógeno en forma de aminoácidos.

#### 5.- PEPTONA DE CASEINA.

Para E. coli, los testigos y los problemas en forma general

presentaron un comportamiento de crecimiento del microorganismo muy similar. Las diferencias pueden encontrarse en el establecimiento de la fase estacionaria. La fase de adaptación se observó de 0 a 2 horas, la fase logarítmica se presentó de 2 a 8 horas y la fase estacionaria de 8 a 24 horas.

Para S. aureus, el microorganismo al utilizar esta materia prima presenta un comportamiento muy similar a E. coli, encontrándose la fase de adaptación entre 0 y 4 horas la fase logarítmica de 4 a 8 horas y la fase estacionaria entre 8 y 24 horas.

#### 6.- PEPTONA DE HARINA DE SOYA.

Para E. coli, los testigos 550-PHS-EC-01, y 550-PHS-EC-02 son muy similares entre sí. Respecto a los problemas 550-PHS-EC-05, 550-PHS-EC-06, los testigos presentaron una fase estacionaria con un valor mayor de absorbancia que los anteriores problemas. La fase de adaptación para testigos y problemas fue observada entre el tiempo 0 y 2 horas, la fase logarítmica de 2 a 4 horas y la fase estacionaria de 4 a 24 horas.

Para S. aureus el testigo 550-PHS-SA-03 y el problema 550-PHS-SA-07, presentan el mismo tipo de gráfica con una fase de adaptación de 0 a 4 horas, una fase logarítmica de 4 a 8 horas y una fase estacionaria de 8 a 24 horas.

La grafica 550-PHS-SA04, presenta una fase logarítmica muy pronunciada de 4 a 16 horas por lo cual en un momento dado se podría suponer que el tiempo de generación sería muy largo.

550-PHS-SA-08, fue la única gráfica cuya fase de adaptación esta comprendida entre 0 y 2 horas. Con una fase de adaptación, logarítmica y estacionaria con un valor de absorbancia 10 veces menor a la de cualquiera de los problemas o testigos.

7.- Peptona de gelatina.

Para E. coli, los testigos 550-Pg-EC-01, 550-Pg-EC-02, presentaron las mayores concentraciones de nitrógeno utilizable con respecto a sus problemas, debido al bajo contenido de nitrógeno utilizable para el crecimiento, es probable que sea necesario enriquecer los medios de cultivo donde se utilicen las muestras 550-Pg-EC-05, 550-Pg-EC-06 y 550-Pg-EC-07.

Para S. aureus, las gráficas comparables con el testigo 550-Pg-SA-03 son 550-Pg-SA-09 y 550-Pg-SA-10, aquí se recomienda para estudios futuros hacer un ensayo más amplio para la interpretación de estas curvas. En el tiempo comprendido entre 4 y 8 horas las curvas presentan un meseta que puede estar en relación con los productos de desecho y/o algún inhibidor. Aquí se recomienda para estudios posteriores considerar curvas de pH para obtener una mayor información del comportamiento de este microorganismo al utilizar esta materia prima.

Para el testigo 550-Pg-SA-04, las graficas que se pueden comparar son las muestras 550-Pg-SA-11, 550-Pg-SA-12, las cuales tienen una fase de adaptación de 0 a 4 horas a diferencia del testigo se encuentra en un punto de valor mayor en absorbancia que sus problemas. Para estas dos muestras (550-Pg-SA-12) posiblemente se tendrán que enriquecer los medios de cultivo en donde se utilicen.

Las cepas con las cuales se elaboraron las curvas de crecimiento de las materias primas antes mencionadas fueron rigurosamente controladas. Para Staphylococcus aureus se realizaron principalmente las pruebas de tinción de gram, crecimiento característico en agar chapman, agar Baird Parker, agar marita sal comun así como sus bioquímicas más característica:

-Oxidasa (-).

-Formación de ácido a partir de carbohidratos:

Lactosa (+)  
manitol (+)  
sacarosa (+)

-VP (+)  
-Reducción de nitratos (+)  
-Licuefacción de gelatina (+)  
-Ureasa (+)  
-Formación de pigmento, oro amarillo (+).

Para E. coli, se utilizaron principalmente los medios de cultivo agar EMB, agar Endo-C, agar BPLE (USP XVIII) y sus bioquímicas:

-Indol (+)  
-Movilidad (+)  
-H<sub>2</sub>S (-)  
-Catalasa (+)  
-Formación de ácido a partir de carbohidratos:  
Lactosa (+)  
sacarosa (+)  
glucosa (+)  
-Formación de gas de TSI (+)  
-UREASA (-)  
-Malonato (-)  
-Citrato (-).

En la elaboración de las curvas de crecimiento se procuró utilizar las cepas (E. coli, S. aureus) cuando presentaran su fase logarítmica de crecimiento en un medio de enriquecimiento. Esto se logró utilizando el caldo nutritivo estándar II, después de una incubación de 20 horas en baño maría a 37°C, con agitación constante. Se estandarizó cada microorganismo en un

rango de 59-61 % de Transmittancia. Todo esto con objeto de obtener un número constante de microorganismos en el momento de hacer las diluciones y la inoculación en la materia prima a analizar. Es importante hacer notar en este punto que se está pasando de un medio rico en una fuente de nitrógeno, carbohidratos y sales a un medio que contiene una única fuente de carbono y como fuente de carbohidratos solo estarán presentes pequeñas concentraciones en forma de impurezas de la materia prima, las sales serán proporcionadas por solución salina fisiológica y pequeñas concentraciones que contiene la materia prima.

Durante las diluciones y la inoculación se extremaron las medidas de seguridad para evitar una contaminación.

En el tiempo de incubación de la materia prima analizada se realizaron frotis para verificar la composición del medio de cultivo, comprobando a su vez la seguridad del método empleado. Otra forma de verificar la pureza del crecimiento es la siembra en un agar de enriquecimiento y la observación de la morfología de las colonias; a su vez se puede sembrar en medios selectivos para grampositivos y gram negativos.

Debido a la poca sensibilidad de nuestro fotómetro (0.005 unidades de absorbancia) no fue posible detectar la concentración de inóculo por lo que las lecturas iniciales en nuestro fotómetro fueron 0.0004 en nuestras curvas semilogarítmicas se refirieron a la unidad más baja siendo este un valor hipotético. Es necesario aclarar que se utilizó el término absorbancia debido a la familiaridad del término al hacer la lectura en un fotómetro, pero en realidad se está obteniendo una lectura de extinción de la luz incidente en el medio de cultivo y no la absorción de una longitud de onda.

La fase logarítmica de las gráficas obtenidas es cualitativa, para que fuera cuantitativa se tendría que determinar el tiempo de generación del microorganismo a utilizar en un medio de enriquecimiento, y en base a esto seguir el crecimiento en

la materia prima que se esta analizando. Por ejemplo, si hipotéticamente se determina un tiempo de generación de 20 minutos de un microorganismo X, al probar este microorganismo en cualquier materia prima las lecturas tendran que ser tomadas con un intervalo de 20 minutos como máximo esto permitiría obtener un tiempo de generación real, de cada una de las materias primas a analizar y de cada uno de los microorganismos que se utilizan. Todo esto es considerado debido a que el método y el criterio utilizados estan enfocados a un trabajo de tipo industrial y no experimental, enfocado como ciencia basica.

Las curvas representan de una forma cualitativa lo siguiente en forma general:

A un crecimiento lento en la fase de adaptación, un intervalo largo y una pendiente en la fase logarítmica de valor numérico pequeño (tiempo de generación elevado). A un crecimiento rapido en la fase de adaptación, un intervalo corto, con una pendiente de valor numérico alto para la fase logarítmica (tiempo de generación pequeño).

No se pudieron determinar índices nacionales. La razón de esto fue debido a que la industria para medios de cultivo no existe en nuestro país, no tenemos capacidad tecnológica industrial para producir dentro del país todas las materias primas para medios de cultivo, pero sí la capacidad para obtener el producto terminado. Se encontró solamente peptona de gelatina en el mercado nacional, pero de una calidad tan variada que se debe de tomar con reserva para la elaboración de medios de cultivo. La peptona de gelatina nacional no tiene como finalidad la industria de medios de cultivo si no la industria alimenticia.

Los testigos de todas las materias primas analizadas en el presente trabajo mostraron una marcada heterogenidad en la distribución de su fase estacionaria, esto puede ser debido a una falta de nitrógeno utilizable; así estudios del contenido de nitrógeno total y nitrógeno en forma de aminoácidos se deben

hacer en forma paralela a las curvas de crecimiento, sin dejar de tomar en cuenta un análisis de metales pesados.

Un análisis de pH sería valioso ya que esto nos daría una idea de la contaminación de productos de desecho a la que está siendo sometido nuestro medio de cultivo, y el tiempo en que se presenta su máximo efecto de inhibición, proporcionando la información para comprender la forma en que afectaría las fases de adaptación, logarítmica y estacionaria.

## 6.0.0 CONCLUSIONES.

1.- Las curvas de crecimiento bacteriano deben de considerarse dentro de los estándares o puntos de referencia para el control de calidad de los medios de cultivo, ya que curvas con un comportamiento estable podrían detectar calidad y cantidad de componentes que en cierto momento pudieran ser referidos.

2.- Las curvas de crecimiento son un análisis fundamental para el control de calidad de los medios de cultivo y se convierten en un arma fundamental para evitar o detectar problemas que se presenten en el crecimiento microbiológico en los medios de cultivo.

3.- Las curvas de crecimiento deben ser complementadas con estudios paralelos de pH, análisis de metales pesados, con centración de nitrógeno total y en forma de aminoácidos.

4.- Este trabajo cumplió con la finalidad de mostrar cu litativa y explicativamente la relación que existe entre crecimiento microbiano y las características del medio de cultivo. Lo cual puede dar un punto de partida a estudios posteriores encaminados no tan solo a la industria de medios de cultivo.

5.- Las materias primas en las que mejor se observaron las fases de adaptación, logarítmica y estacionaria. fueron Extracto de Levadura, Peptona de Marisa de Soya, Peptona de Carne (por digestión triptica y peptica). Esto pudo deberse a su alto contenido de nitrógeno utilizable por los microorganismos.



7.0.0 BIBLIOGRAFIA.

- 1.- KRUIF, Paul de, Los cazadores de microbios., (tr. Dr. Gregory Warren), 9 na. ed., México, Ed. Epoca, 1976.
- 2.- STAINER, Roger Y, et.al., The microbial world, 4 ta. ed., by Prentice-Hall, Inc. Englewood cliff, New Jersey, 1976.
- 3.- THATCHER, F.S. y D.S. Clark, Análisis microbiológico de los alimentos. (tr. Dr. B. Moreno Garcia), Zaragoza, España, Ed. Acribia.
- 4.- COSTIN, I.D., et. al. An outbreak of food poisoning in adults associated with Escherichia coli, serotype 86'. Pathol. Microbiol, 27, 1964.
- 5.- CLEERE, R.L., et.al. Shigellosis in Denver, Colorado. An investigation of a Shigella surveillance report N°14, Colorado, 3, 1967.
- 6.- TOPLEY, W.W.C., Bacteriología e inmunología, Tomo I, 2 da. ed, (1953, reimpresión). Barcelona, España, Ed. Salvat Editores, 1949.
- 7.- DAVIS, Bernard D., et. al., Tratado de microbiología y genética molecular, 2 da. ed., Barcelona, España. 1980.
- 8.- LEHWINGER, Albert L., (tr. Pro. Dr. Fernando Calvet Prats), Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2 da. ed., Barcelona, Ed. Omega, 1980.
- 9.- ZINSSER, David T. et. al. Bacteriología de Zinsser, (tr. Antonio Capella Bustos). 2 da. ed., Barcelona, Unión tipográfica editorial americana (UTMA).

- 10.- MANUAL: Medios de cultivo Bioxon y reactivos de diagnóstico , numero I, 1980.
- 11.- MANUAL de microbiología: medios de cultivo deshidratados para microbiología. (tr. Dr. Antonio Núñez Cachaza), E. Merck (R.F. Alemania).
- 12.- ANTHONI, H Rose, PH. D., Microbiología química, (tr. Dimas Fernandez Galeano), 3 ra. ed., Ed. Alhambra, 1977.
- 13.- KRUSE, Paul R. (COP), (Ed), Tissue culture; Methods and applications. New York, Academic, 1973.
- 14.- WARING, W.S., and Werkman, E, H, Growth of bacteria in iron-free medium, Arch. Biochem. 1: 303-310, 1942.
- 15.- ROCHFORD, E.J., and Mandle, R.J., Production of chains by *Diplococcus pneumoniae* in magnesium deficient media, J. Bact. 66: 554-560, 1953.
- 16.- HENDERSON, L.M., and Snellm E. E., Uniform medium for determination of aminoacids with varios microorganisms, J. Bio. Chem. 172: 15-29, 1948.
- 17.- HOTCHKISS, R. D. Gramicidin, tyrocidine, and tyrothricin, Advances Enzymol. 4: 153-159, 1944.
- 18.- BALE, E.F., and Mullins, L.J., Radioactivity of potassium from human sources, J. Gen. Physiol. 25:345-353, 1942.
- 19.- FINEGOLD, S. M., et. al., Scope monograph on anaerobic infections. E. Baird A. Tomas. Pub. Up John, Co Kalamazoo. Mich. E.U.A. A.R.7, 1972.
- 20.- MANUAL de laboratorio de bacteriología medica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Departamento de Microbiología, 3 ra. ed., 1979.

- 21.- WATT, D., and Werkman, C.H., Modification of enzyme system of *Micrococcus pyogenes*, Arch. Biochem. 31: 383-390, 1951.
- 22.- LICKELSON, M., and Werkman, C.H.. Influence of pH on dissimilation of glucose by *Aerobacter indologenes*, J. Bac. 36: 67-76, 1938.
- 23.- RAHN, O., Physical methods of sterilization of microorganisms, Bact. Rev. 9: 1-47, 1945.
- 24.- KUNTSCHER U. Gahrig. Ampullierung.
- 25.- JAY, James M.. (tr. Dr. Jose Tormo Iguacel ), Microbiología moderna de los alimentos, Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1973.
- 26.- LUYET, B. J.. Case Against cell theory, Science 91: 225-252, 1940.
- 27.- BENDINA, George., (tr. Roberto Fatch Fabre)., Técnicas de Bioquímica aplicada, Ed. Interamericana, México, 1974.
- 28.- DAVIDSOHN, M.D., John Bernard Henry, Diagnóstico clínico por el laboratorio, 6 ta. ed., Ed. Salvad Editores, Barcelona, España, 1978.

8.0.0 RESUMEN.

Se han presentado las curvas de crecimiento de 14 extractos y 42 peptonas, utilizando para ello los microorganismos E. coli y S. aureus. Se utilizaron testigos de procedencia europea y norteamericana.

Los datos nos permitieron observar las fases de adaptación, logarítmica, y estacionaria, principalmente en extracto de levadura, peptona de harina de soya, peptona de carne (por digestión triptica y péptica). Del analisis de estas fases se puede predecir el comportamiento de materias primas al ser incorporadas a medios de cultivo. La importancia de estudios paralelos de pH, metales pesados, concentración de nitrógeno total y nitrógeno en forma de aminoácidos, nos permite tener una idea más amplia y clara de la constitución de la materia prima y su influencia en el crecimiento bacteriano.

Las curvas de crecimiento se pueden utilizar para un control de calidad en la producción en este caso de medios de cultivo. Pero su uso puede ser extrapolado a todas esas areas donde el trabajo requiera de la utilización de microorganismos y medios de cultivo, lo que va a estar relacionado con la salud pública, la salud animal, la agricultura, la industria alimenticia y químico-farmacéutica.

En el presente trabajo los datos obtenidos son cualitativos principalmente. Ya que para hacerlos cuantitativos se tendría que obtener un número mayor de resultados, dependiendo de la velocidad de crecimiento del microorganismo.

Debido a los escasos reportes recientes sobre el tema de materia prima de los medios de cultivo la revisión bibliográfica tuvo que referirse a los años de 1938 en adelante.