

2.30



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

**FORMULACION DE UN MEDIO DE CULTIVO
PARA BACTERIAS ANAEROBIAS A BASE DE
PULQUE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

LAURA LETICIA ROJO GARCIA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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

1)	INTRODUCCION	1
2)	FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA	26
3)	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
4)	OBJETIVOS	29
5)	HIPOTESIS	29
6)	MATERIAL Y EQUIPO	30
7)	METODOLOGIA Y RESULTADOS	33
8)	ANALISIS DE RESULTADOS	61
9)	CONCLUSIONES	64
10)	BIBLIOGRAFIA	66

1. INTRODUCCION

1.1 BACTERIAS ANAEROBIAS

Las bacterias anaerobias se definen como aquellas bacterias incapaces de multiplicarse en presencia de oxígeno. Aunque se consideran de un espectro continuo, desde los microaerofilicos; microorganismos que crecen mejor en una atmósfera con baja concentración de oxígeno (O_2), microorganismos aerotolerantes; bacterias anaerobias que pueden sobrevivir aún con cierta concentración de oxígeno (O_2), hasta las bacterias anaerobias obligadas estrictas que solo crecen en ausencia de oxígeno. (8,10,19) .

1.1.1. IMPORTANCIA CLINICA

Las bacterias anaerobias desempeñan un papel importante en muchas enfermedades infecciosas de riesgo mortal, las cuales pueden afectar a cualquier región anatómica del cuerpo, siempre que las condiciones de potencial oxidoreductor en los tejidos sean apropiados para ello. (6).

Las bacterias anaerobias participan comunmente en abscesos de cualquier órgano (cerebro, pulmón, hígado, trompas y ovarios), produciendo actinomicosis, apendicitis, bacteremia, colecistitis, otitis media, infecciones dentales, sinusitis y otras infecciones. La mayor parte de las infecciones anaerobias se deben a bacterias de fuente endógena (la flora normal, el tracto genitourinario y la piel), aunque también no son menos impor --

tantes las enfermedades exógenas causadas por anaerobios; estas incluyen el botulismo alimenticio y el de las heridas, la gastroenteritis debido a C.perfringens tétanos, mionecrosis clostridial (gangrena gaseosa), celulitis crepitante, etc. (8,20,21).

Los hallazgos o las claves clínicas que sugieren infecciones por bacterias anaerobias incluyen; lesión muy cerca a una superficie mucosa, deterioro de la irrigación sanguínea, necrosis tisular, trauma quirúrgico, crecimiento de anaerobios o aerobios facultativos. Todo esto tiende a disminuir de oxidación-reducción, lo que contribuye a formar un medio favorable al crecimiento anaeróbico. (6,9,21) .

Hace algunos años no se realizaban procedimientos anaerobios en los laboratorios por varias razones; los únicos patógenos generalmente reconocidos entre los anaerobios eran unos pocos esporulados, microorganismos que daban lugar a estados patológicos fácilmente diagnosticados con los hallazgos clínicos, además existía cierta incertidumbre no sólo en cuanto a los métodos sino también con respecto a la identificación de los mismos. Pero en los últimos años dado a que las infecciones anaerobias no son raras, se ha dado un poco de mayor interés a su estudio. (9,20).

Para la identificación correcta de los microorganismos anaerobios es importante considerar una serie de precauciones que se inician desde la toma de muestra hasta su total identificación. Es necesario tener cuidado de evitar la contaminación con la flora normal, recoger muestras de sitios activos de infección, mantenerlas en condiciones anaeróbicas después de obtenerlas hasta su inoculación en los medios de cultivo. (3,6,10).

Las muestras clínicas aceptables para el cultivo de bacterias anaero

bias son; aspirados purulentos, tejido (biopsia, autopsia), líquidos corporales (LCR, pleural, paracentesis, pericárdio, sinovial), aspirados trans-traquiales, aspirados pulmonares directos. (8,17,21).

Las muestras que deben cultivarse rutinariamente para bacterias anaerobias son; hisopados de garganta o nasofaringe, hisopados gingivales, esputo, expectorado, contenido gástrico, contenido del intestino delgado, heces hisopados rectales, orina evacuada e hisopados vaginales o cervicales.

El examen macroscópico de muestras clínicas pueden dar información sobre la naturaleza del material recogido; olor fétido, aspecto purulento, necrosis de tejido, gas en el tejido o gránulos de azufre, deben sugerir la posibilidad de anaerobios. (6,10,18).

El examen microscópico directo de muestras clínicas permite observar el tipo de células presentes, el número y los rasgos morfológicos de los microorganismos. Los hallazgos de éste examen microscopico directo que concuerdan con la presencia de anaerobios incluyen: grandes bacilos grampositivos anchos de extremos romos (posible C. perfringens), bacilos gramnegativos pleomórficos pálidos que se colorean irregularmente (Bacteroides o Fusobacterium), bacilos gramnegativos palidos, filamentosos de extremos puntiagudos (F. nucleatum). (3,20).

Racimos y cadenas de cocos gramnegativos dentro de un exudado de una herida intraabdominal (Peptococcus o Peptoestreptococcus).

1.1.2 MEDIOS DE CULTIVO

El procedimiento crítico de la microbiología anaerobia es el aisla -

miento. El aislamiento primario de bacterias anaerobias obligadas implican el uso de medios nutricionalmente adecuados, suplementados con hemina y vitamina K, por ejemplo; agar sangre para anaerobios que contiene; agar -soya, tripticasa, extracto de levadura, hemina, vitamina K, L-cistina y -sangre de oveja. Otros medios poseen sustancias reductoras para permitir una cierta selectividad, por ejemplo el agar anaerobio según Brewer que -contiene: peptona de caseína, peptona de soya, extracto de levadura, L-cistina, D-glucosa, tioglicolato, sodio formaldehído, sulfoxilato y azul de metileno. (14,20).

MEDIOS SELECTIVOS

Los medios selectivos son empleados en casos de pequeñas cantidades de muestras, dentro de los cuales están; agar sangre alcohol feniletílico y agar sangre paramomicina-vancomicina (inhibe grampositivas), agar yema de huevo-neomicina, que es empleado generalmente para el aislamiento de especies de Clostridium pues las reacciones de lipasa y lecitinasa ofrecen buenas características diferenciales sólo que éste medio inhibe a diversas bacterias gramnegativas anaerobias facultativas. (14,18,20).

MEDIOS LIQUIDOS

Existen diversos tipos de medios de cultivo líquidos para bacterias anaerobias propios para la recuperación de las mismas, algunos de éstos medios contienen polianetol sulfamato de sodio que es recomendable para -

ciertas bacterias anaerobias aunque también puede ser inhibidor de algunos cocos anaeróbios. Los medios líquidos más comunmente empleados son: - caldo soya tripticasa, caldo thiol, caldo columbia, medio tioglicolato, - caldo infusión cerebro corazón suplementado con extracto de levadura previamente reducido y esterilizado anaeróbicamente, caldo peptona con suplemento y caldo carne picada-glucosa suplementada con vitamina K y hemina .

El uso de medios de cultivo líquido como la única técnica de cultivo anaeróbica no resulta satisfactoria, excepto en el caso de hemocultivo, - por lo que los medios de cultivo líquido sólo deben usarse como auxiliares de otros métodos de cultivo anaeróbico.

Por otro lado el factor fundamental para el éxito de los cultivos anaerobios es el transporte de las muestras cuando éstas no pueden ser inoculadas inmediatamente, entonces las bacterias deben ser protegidas de los efectos letales del oxígeno desde el momento de la obtención de la muestra hasta que es colocada en un medio anaeróbico. Un medio de transporte anaerobio; consistente en un tubo con doble tapa que contiene CO_2 o N_2 libre de oxígeno y un sistema de caldo o agar con indicador. El espécimen se inyecta a través de un tapón de goma evitando la introducción de aire. El material puede mantener en este medio anaeróbico hasta el momento de su inoculación al medio de cultivo, cuando se extrae utilizando una aguja y jeringa. Cuando sólo se puede obtener una muestra por medio de un hisopo (aunque menos conveniente), resulta útil un sistema de dos tubos. El hisopo se encuentra adherido al tapón de goma de un tubo en el que se mantiene una atmósfera anaerobia. Después de la obtención del espécimen, se coloca el hisopo en el medio de transporte semisólido, como caldo infusión ce

rebroy corazón suplementado con extracto de levadura previamente reducido y esterilizado anaerómicamente (PRAS). (8,9,10,20).

1.1.3 SISTEMAS DE ANAEROBIOSIS

Las bacterias anaerobias requieren medios más ricos que los de uso común, una incubación más prolongada, empleándose dos días generalmente para el aislamiento, así como sistemas de incubación adecuado como son: las jarras anaerobias con generador Gas Pak, técnica de evacuación/reemplazo, cajas guantes y tubo arrollado, dan recuperaciones muy buenas. El empleo de estos sistemas exige; a) que los medios sean nutricionalmente a adecuados, frescos y debidamente reducidos b) que el sistema se use adecuadamente y contenga catalizador activo (en jarra o cajas). Los factores -- que determinan el tipo de equipo a utilizar depende del espacio, número de muestras, costo de equipo y de los medios usados.

La jarra anaeróbica es un recipiente de plástico, vidrio o metal con cierre hermético, después de cerrar la jarra, el agregado de una mezcla gaseosa que contiene hidrógeno (H_2) en presencia de un catalizador reduce el oxígeno dentro de la jarra formando agua, por ejemplo la jarra Gas Pak usa un catalizador que consiste en granos de alúmina recubierta de paladio al 0.5%, éste catalizador es activo a temperatura ambiente. Dicho sistema usa un sobre generador de hidrógeno (H_2) dióxido de carbono (CO_2), que contiene dos tabletas una de ácido cítrico más bicarbonato de sodio que produce dióxido de carbono, y la tableta de borohidruro de sodio que

libera hidrógeno (H_2). El sobre se activa por la adición de agua, la cual pasa a través de una serie de canales hacia un papel filtro, que regula el flujo de agua hacia las tabletas generadoras de gas, proporcionando una liberación controlada de gases.

El hidrógeno generado a partir de la tableta de borohidruro de sodio, se combina en presencia del catalizador de paladio con el oxígeno que hay dentro de la jarra para formar agua dentro del compartimiento donde están las tabletas mientras se coloca la tapa sobre la jarra. Aproximadamente se produce de 467 % de dióxido de carbono (CO_2) a partir de la tableta de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), más bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), que sirve para estimular el crecimiento de algunos anaerobios que lo requieren.

El catalizador puede ser inactivado por ácido sulfhídrico (H_2S), cloro (Cl_2) por lo que los gránulos deben reemplazarse cada vez que la jarra se usa con gránulos nuevos o rejuvenecidos. La actividad del catalizador puede restaurarse calentándolo en un horno de calor seco a $160-170^{\circ}C$ durante dos horas, por lo menos.

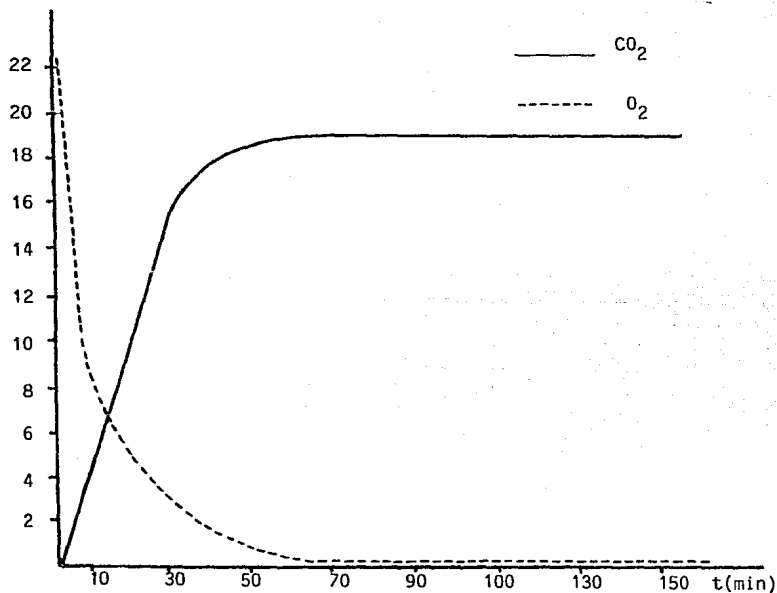
Otras condiciones anaeróbicas pueden establecerse en las jarras con la técnica E/R (evacuación/reemplazo), la cual se da por una mezcla gaseosa apropiada, formada de: 10% de hidrógeno, 5% de dióxido de carbono, 85% de nitrógeno. Para llevar a cabo el procedimiento, es necesario el uso de bolitas reactivas de catalizador, se evacua la jarra de 51 a 61 cm de mercurio (hg) y se llena con N_2 , se repite éste ciclo por tres veces y por último se llena con la mezcla gaseosa anaerobia.

Otro tipo de sistema anaerobio es la caja de guantes anaeróbica que consiste en una cámara de gas sellada con puertas en forma de guantes y una cerradura.

Para la transferencia de materiales dentro y fuera de la cámara. Una atmósfera que contiene hidrógeno (H_2) se hace recircular a través del catalizador (paladio) para eliminar el oxígeno del interior de la cámara, colocando una bomba de vacío, un tanque gaseoso mixto que contiene 85 % de N_2 , 10 % de H_2 y 5 % CO_2 y un tanque de N_2 éste último no es esencial pero ayuda a conservar la mezcla gaseosa. Los medios se incuban dentro de un incubador colocado dentro de la cámara, o bien toda la cámara puede mantenerse a $35^{\circ}C$.

Por último, el sistema anaeróbico utilizado en este trabajo es el de jarra con Anaerocult A. El cual contiene componentes químicos que proporcionan una atmósfera libre de oxígeno. Dichos compuestos son : tierra de sílice, polvo de hierro, ácido cítrico y carbonato de sodio, el paquete se activa con la adición de agua, la cual pasa a través de un papel filtro que regula el flujo de agua controlando la liberación de los gases, el H_2 se combina en presencia del catalizador con el oxígeno que hay dentro de la jarra para formar agua, además se produce dióxido de carbono (CO_2) a partir de la tableta de ácido cítrico, más bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$), contribuyendo al crecimiento de algunos anaerobios que lo requieren. La siguiente gráfica describe la proporción de oxígeno con respecto al tiempo. (10,16,18,19).

Vol (%) oxígeno/dióxido de carbono



La temperatura de incubación comunmente usada para el aislamiento primario y el cultivo de casi todas las bacterias anaerobias es de 35°C. Puede cultivarse de 4 a 6 horas en cultivos de caldo enriquecido de carne cocida-glucosa y tioglicolato incubados a 46°C en casos de tratarse de la bacteria llamada C.perfringens.

Los medios de placa en jarra anaeróbica deben incubarse comunmente por lo menos antes de abrir la jarra. Los medios sólidos de aislamiento primario de

ben reincubarse durante 5 a 7 días, por lo menos. Esto permite la recuperación de los anaerobios de crecimiento lento.

Si la situación clínica justifica el examen de las placas de cultivo antes de las 48 hrs y si el espécimen es adecuado, se deben preparar cultivos por duplicado en jarras separadas, de manera que pueda examinarse uno de ellos a las 12 o 24 hrs, y otro a 48 hrs o más .(3,10,20)

1.1.5. IDENTIFICACION DE ANAEROBIOS

Los anaerobios pueden identificarse presuntivamente por medio de un número relativamente pequeño de pruebas que incluyen:

- 1) Relación con el oxígeno
- 2) Características microscópicas
- 3) Características coloniales
- 4) Crecimiento en medio líquido
- 5) Características Bioquímicas (medios).

1) Relación con el Oxígeno.

Para determinar la relación con el oxígeno de colonias en medios sólidos anaeróbicos pueden realizarse:

- a) Una placa de agar sangre anaerobio para incubar anaeróbicamente.
- b) Una placa de agar sangre aerobio para incubar en una jarra de extinción de vela o en un incubador con 5. a 10 % de CO₂.
- c) Una placa de agar sangre aerobio a incubar en aire ambiente.

Incubar cada placa 48 hrs como mínimo a 35° C o más tiempo (5-7 días).

Registrar la relación con el oxígeno como anaerobio obligado, anaerobio aerotolerante, microaerófilicos o aerobio facultativo como se muestra en el cuadro No. 1 . (7,10,18).

CRECIMIENTO RELATIVO EN
AGAR SANGRE EN:

Microorganismo	Aire	Jarra con vela	Sistema anaero- bico	Clasificación
<u>Pseudomona</u> <u>aeruginosa</u>	++++	++	- 6 - +	Aerobio Obligado
<u>Escherichia</u> <u>coli</u>	++++	++++	++	Anaerobio Facultativo
<u>Campilobacter</u> <u>fetus</u>	+ 6 -	+ a +++	+ 6 +	Microaerofi lo
<u>Clostridium</u> <u>tertium</u>	+	+ 6 ++	++++	Anaerobio aerotolerante
<u>Bacteroides</u> <u>fragilis</u>	--	-	++++	Anaerobio Obligado

Cuadro No 1. Clasificación de microorganismos, dependiendo del creci-
miento relativo en agar sangre a diferentes atmósferas.
(Lennette, E. Manual of Clinical Microbiology, 4a edition
Washington 1985).

2) Características Microscópicas

En relación con la reacción de Gram, la presencia o ausencia de esporas, movilidad y flagelos son puntos claves.

Muchos anaerobios obligados clasificados como gram positivos son gram-variable. Otros aspectos que se consideran son; forma de células, tamaño, características intracelulares (vacuolas, gránulos etc), ramificaciones, pleomorfismo y disposición de células. (8,20).

3) Características coloniales.

Observar la superficie del agar para detectar características coloniales, crecimiento extendido, colonias fluorescentes, color o pigmento, elevación, borde, superficie, consistencia, ya que las características coloniales varían en diferentes formulaciones de agar sangre anaerobio. Así como también es útil verificar la presencia de hemólisis. (10,11).

4) Crecimiento en Medios Líquidos

Observar el crecimiento en medio líquido de tioglicolato enriquecido de 24 a 72 hrs. Notando la rapidez (rápido, moderado, lento) y el aspecto del crecimiento, producción de gas y olor.

5) Características Bioquímicas (medios)

- Reacción en agar yema de huevo (lecitinasa, lipasa, proteólisis).
- Producción de indol, ácido sulfídrico (H_2S) y ureasa.
- Hidrólisis de esculina y almidón.
- Fermentación de hidratos de carbono (glucosa, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa, xilosa, salicina, glicerol, arabinosa, manosa, - ramnosa, trehalosa).
- Reducción de nitratos.

Acción sobre la leche-hierro (proteólisis de proteínas lácteas) ,
gelatina (hidrólisis), carne cocida (digestión de partículas)
(9,11,20).

1.1.6. microorganismos anaerobios empleados

1.1.6.1. BACTEROIDES

Son bacilos no esporulados, anaerobios obligados que a menudo son muy pleomórficos.

Morfología: bacilos no móviles, se tiñen ligeramente, gramnegativos, rectos o ligeramente curvos, la colonia es irregular, en el caso de B. melaninogenicus, son pleomórficos de coloración uniforme gramnegativos (8,10,11).

Crecimiento y Metabolismo: crecen bien anaeróbicamente en agar sangre y en medios enriquecidos que contienen peptona y extracto de levadura las colonias son en su mayoría circulares, enteras, convexas, semiopacas o brillantes, de 0.5 mm-3 mm, (10,20).

En medios líquidos el crecimiento de bacterias causa enturbiamiento y con frecuencia un sedimento que puede ser homogéneo, fibroso o filamentoso.

Crece mejor a 37°C, con pH aproximado a 7, su metabolismo energético es prácticamente desconocido, hay evidencia de que B. fragilis tiene un tipo primitivo de sistema de transporte de electrones con citocromo ligado a la reducción de fumarato, otros parecen ganar energía de la transferencia de electrones de hidrógeno o formiato a fumarato (11,19).

Tienen necesidad obligada de vitamina B₁₂, el crecimiento se estimula con hemina y bilis, el amonio es la fuente de nitrógeno preferida en lugar de los aminoácidos, así como un hidrato de carbono fermentable es e--

sencial para un buen crecimiento.

Los productos de fermentación incluyen combinación de ácido acético, láctico, succínico, propiónico, isobutírico, isovalérico y fórmico.

1.1.6.2. CLOSTRIDIUM

Son bacilos esporulados anaerobios y aerotolerantes que tienen amplia distribución. Como los Clostridium, son miembros de la microflora normal del intestino, su presencia en una muestra clínica no implica necesariamente un estado patológico.

Clostridium perfringens se encuentra en gran variedad de cuadros clínicos, desde una contaminación de una herida hasta mionecrosis traumática o no traumática colecistitis gangrenosa, infección postaborto, hemólisis intravascular, neumonía necrosante, epiema y enteritis necrótica. Es uno de los microorganismos que es causante de gangrena gaseosa en un 80% .

El crecimiento satisfactorio se realiza en agar sangre anaerobio y medio de yema de huevo para la busqueda de producción de lecitinasa fosfolipasa o lipasa.

El crecimiento se presenta durante 2-7 días a 35°C aunque dos días son suficientes si el crecimiento es rápido. Es recomendable cultivar dichas bacterias en carne cocida para determinar la presencia, posición y forma de los esporos, aunque para la identificación de éstos se determinan los hidratos de carbono fermentados, determinación de productos metabólicos así como pruebas de toxinas para la identificación plena de algunas especies de Clostridium.

También puede realizarse una identificación presuntiva por medio de reactivos comerciales de anticuerpos fluorescentes, así como características microscópicas y macroscópicas de crecimiento (morfología colonial, hemólisis etc.) (10,11,20).

1.2. INFORME BREVE SOBRE EL PULQUE

1.2.1. DEFINICION.

El pulque es un líquido blanco, viscoso, dulce, con bajo contenido alcohólico y con cierto sabor ácido, obtenido por la fermentación de agua -- miel, el cuál es el jugo que se obtiene del maguey. (2).

1.2.2. IMPORTANCIA.

Esta bebida posee importancia desde varios puntos de vista como son; geográfico, económico, bioquímico y sanitario.

Desde el punto de vista geográfico tiene importancia el hecho de que esta planta, vive con poca cantidad de agua anual, esto es, el maguey se desarrolla en zonas semidesérticas de la antiplanicie mexicana donde no se cuenta con suficiente agua. Evita el desgaste de las tierras inhibiendo la erosión al mantenerse las plantaciones en buen estado todo el tiempo. Ligado a esto está el lado económico del maguey.

El pulque posee múltiples sustancias como vitaminas, sales minerales, aminoácidos esenciales, y una pequeña cantidad de proteínas, que son requeridas para la dieta del ser humano, por lo que al proporcionar estas sustancias al organismo, éste podría ser menos susceptible a diversas enfermedades como: la anemia por deficiencia de ácido fólico y de hierro, proporcionando mayor estabilidad en las reacciones corporales.

1.2.3. ORIGEN DEL PULQUE.

Antes del descubrimiento de América, los habitantes del centro de la República ya aprovechaban el maguey de diferentes formas tales como en la elaboración de sus chozas, fabricación de hilos, tejidos, escudos, sandalias

El principal producto que se obtenía de éste era el pulque, que se les daba a los reyes y personas de gran autoridad, pues su consumo no era permitido para todos. En la sociedad de los indígenas, había grandes castigos que se aplicaban a la gente que negociara clandestinamente con este líquido.

Con la llegada de los españoles, el consumo de pulque se extendió ampliamente y se reglamentó su comercio. Las autoridades españolas intentaron varias veces restringir el comercio de éste y hasta prohibirlo entre los indios, pero al no lograrlo, crearon nuevas reglamentaciones para su comercio.

El origen etimológico de la palabra pulque tiene varias posibles raíces. El nombre de pulque entre los mexicanos era "iztacotli" o sea vino blanco y cuando se descomponía se le conocía como "octli-poliuqui", y como esto sucedía fácilmente, se piensa que los que lo vendían pronunciaban la palabra poliuiqui, derivándose de ésta la palabra pulque que en la actualidad se maneja.

Por otro lado se propuso que dicha palabra es voz araucana derivada de pulqui, una bebida preparada de algarroba mientras que muchos piensan que es de origen antillano.

En el siglo pasado el pulque despertó interés para su investigación,

por el hecho de que se obtenía de un jugo natural de los magueyes llamado aguamiel y que fermentaba por sí sólo con microorganismos autóctonos. Aparte de ser un líquido embriagante, se le conocían propiedades nutritivas - en la alimentación mexicana.

Desde 1964 se iniciaron las primeras investigaciones microbiológicas continuando en 1919 con un análisis químico y bromatológico. (2,12).

1.2.4. COMPOSICION DEL PULQUE

La composición química y bromatológica del pulque varía dependiendo del lugar donde se encuentre; sea tinacal, aduana o pulquería. Aunque para la realización de los estudios se hace una media de tales variables por lo que las siguientes tablas presentan de manera general la composición del mismo.

<u>ANALISIS DEL PULQUE (2)</u>	Cant. en 100g
ENERGIA	43 Kcal
PROTEINA	0.4 g
GRASAS	----
CARBOHIDRATOS	1.1 g
CALCIO	12 mg
HIERRO	0.7 mg
TIAMINA	0.02 mg
RIBOFLAVINA	0.02 mg
NIACINA	0.4 mg

COMPOSICION QUIMICA DEL PULQUE (5,15)

DENSIDAD a 15°	0.992
GRADO DE ALCOHOL	7.9 %
ACIDEZ TOTAL EN ACIDO LACTICO	0.39 %
EXTRACTO SECO A 10°C	1.65 %
CENIZAS	0.30 %
PROTEINAS TOTALES	0.345 %
GOMAS	0.66 %
SACAROSA	0.04 %
AGUA	94 %
SALES MINERALES	0.32 %
NITROGENO PROTEICO	0.03 %
NITROGENO DE AMINOACIDOS	0.01 %

NITROGENO DE AMINOACIDOS AROMATICOS	0.081 %
GLICERIDOS	0.00
GLUCIDOS	9.5 %
VITAMINA C	6.5 UI/ml
VITAMINA B	25-30 UI/ml

ANALISIS MICROBIOLOGICO (2)

	TINACAL	ADUANA	PULQUERIA
BACTERIAS X 10 ⁶ /ml	64	36	15
LEVADURAS X 10 ⁶ /ml	166	115	61
COLIFORMES FECALES % EN TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS	22.2	32	5.3

CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN EL PULQUE (12.13).

	Cant. en 100g
LISINA	3.43 g
TRIPTOFANO	0.57 g
HISTIDINA	1.0 g
FENILALANINA	2.38 g
LEUCINA	2.23 g
TREONINA	1.36 g
METIONINA	0.15 g
VALINA	1.40 g
ARGININA	2.32 g

ANALISIS QUIMICO (2)

	TINACAL	ADUANA	PULQUERIA
pH	3.98	3.73	3.84
VISCOSIDAD (centipoises)	9.12	13.83	3.075
SACAROSA mg/100 ml	114.4	97.33	85.36
ALCOHOL % en Vol ⁰ G1	5.56	7.16	6.33

CONSTITUYENTES NUTRITIVOS DEL PULQUE (2,5,15).

COMPONENTES Y FACTORES NUTRITIVOS	Cant. en 100 g
humedad	98.3 g
PROTEINAS	0.37 g
ENZIMAS	0.24 g
CALCIO	11.0 mg
FOSFORO	6.0 mg
FIERRO	0.70mg
CAROTENO (PRO-VIT A)	0.0 mg
TIAMINA (VIT B ₁)	0.02 mg
RIBOFLAVINA (VIT B ₂)	0.03 mg
NIACINA	0.35mg
VITAMINA C	5.1 mg
CARBOHIDRATOS TOTALES	0.08 g

2. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

Las bacterias anaerobias se definen como aquellas incapaces de multiplicarse en presencia de aire, por lo que es necesario tener una baja tensión de oxígeno y bajo potencial de oxidación-reducción para el buen desarrollo de éstas.(20).

Las bacterias anaerobias, en el hombre, predominan normalmente en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal sobre todo en el colon, donde exceden en número a las coliformes en por lo menos 1000:1, en los orificios del tracto genitourinario y en la piel. (7).

Anteriormente se le daba importancia a esta clase de bacterias por que la mayoría de las infecciones producidas por bacterias anaerobias incluyen también bacterias aerobias, identificándose éstas últimas sin dificultad, en tanto que las bacterias anaerobias por su dificultad de cultivo e identificación no se tomaban en cuenta. En la actualidad se le ha dado una importancia considerable pues los cuadros clínicos que se presentan por causa de bacterias anaerobias son muy graves. Siendo de las principales infecciones; mionecrosis (gangrena), tétanos, aborto séptico, gastroen teritis, endocarditis, mionecrosis clostrídica, meningitis, osteomielitis, sí nusitis y otras. (8,9,10,12).

Como se observa, el diagnóstico de bacterias anaerobias es de gran importancia para el establecimiento de un tratamiento oportuno y adecuado

Por otra parte, el pulque posee sustancias nutritivas como; vitaminas (tiamina, riboflavina, vitamina C), aminoácidos (lisina, triptofano, histidina, fenilalanina, leucina, metionina, valina, arginina), proteínas, carbohidra-

tos etc. Y sustancias reductoras, por ejemplo; ácido ascórbico, niacina, algunos carbohidratos, etc. Sales minerales (cálcio, fósforo, hierro), sustancias que lne dan sus propiedades características , por lo que puede ser utilizado como un medio de cultivo adecuado para bacterias anaerobias Así como un factor de enriquecimiento para el desarrollo de microorganismos exigentes.

El empleo de este medio de cultivo reduciría los costos debido a que el pulque es un producto netamente mexicano y se encuentra en abundancia en casi toda la República Mexicana, a un costo relativamente bajo. (2,3, 4,12,15).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El diagnóstico de infecciones producidas por bacterias anaerobias implica un alto costo y un mayor trabajo, por lo que no en todos los laboratorios se trabajan estos microorganismos con un buen margen de seguridad, es decir, que se dan falsos positivos o bien falsos negativos.

Usualmente se emplea una cámara formada por un recipiente cerrado en el cual se coloca una vela encendida que consume el oxígeno contenido en el recipiente produciendo una atmósfera parcial de CO_2 que favorece el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas sin desarrollarse crecimiento de bacterias estrictamente anaerobias como es el caso de bacteroides.

Por lo que se pretende formular un medio de cultivo altamente reductor que favorezca el crecimiento de las bacterias anaerobias a un costo menor en comparación con los medios de cultivo usuales, facilitando el estudio de este tipo de microorganismos sin muchas complicaciones y en las condiciones de cualquier laboratorio.

4. OBJETIVOS

- 1.- Observar el desarrollo de los microorganismos en un medio sólido de pulque.
- 2., Adecuar el medio sólido de pulque a las condiciones de microorganismos exigentes.
- 3,- Formular un medio de cultivo para bacterias anaerobias utilizando - pulque.
- 4.- Disminuir los costos para el diagnóstico de infecciones bacterianas anaerobias
- 5.- Realizar un estudio comparativo del medio de cultivo formulado con respecto a medios usuales .

5. HIPOTESIS

Si el medio formulado tiene las características nutritivas y reductoras adecuadas se fomentará el desarrollo de bacteria anaerobias , flogrando con ello una mayor seguridad en el diagnóstico de infecciones por microorganismos anaerobios .

6. MATERIAL Y EQUIPO

Material Biológico:

- Cepa pura de Clostridium sp
- Cepa pura de Clostridium histolyticum
- Cepa pura de Escherichia coli
- Cepa pura de Neisseria sp
- Cepa pura de Pseudomona aeruginosa
- Cepa pura de Proteus vulgaris
- Cepa pura de Staphylococcus aureus
- Cepa pura de Estreptococos hemolíticos

Equipo:

- Agitador mecánico para tubo de ensaye, Vortex/ Genie modelo K-550-G.
- Balanza analítica METER modelo H-80
- Balanza granataria CHAUS, modelo Florham Park
- Contador de colonias SOL=BAT, modelo No 432
- Espectrofotómetro BAUSH AND LOMB, modelo Espectronic 20
- Incubadora MAPSA, modelo EC-334
- Microscopio AMERICAN OPTICAL, modelo One-ten.
- Refregerador Mabe, modelo Space linea.

Material de vidrio.

- Cajas Petri
- Pipetas graduadas
- Pipetas pasteur

Portaobjetos

Recipiente para anaerobiosis

Tubos de ensaye

Vasos de precipitado de diferente capacidad

Colorantes

Cristal violeta

Lugol

Alcohol-acetona

Safranina

Verde brillante

Medios de cultivo:

Base Agar Sangre (Merck)

Peptona de Caseína para bacteriología (Merck)

Glucosa para bacteriología (Merck)

Agar Brewer para anaerobio (Merck)

Agar alcohol feniletílico

Caldo tioglicolato

Solventes

Acetona (Merck)

Agua destilada

Alcohol etílico absoluto (Merck)

Eter etílico anhidro

Pulque

Soluciones y Reactivos:

Solución de Hidróxido de sodio 2N.

Solución salina

Solución de ácido clorhídrico

Solución de ácido bórico

Solución azul de metileno 0.58 %

Sulfato de cobre

Disodiohidrógeno fosfato

Carbonato de sodio

Bisulfito de sodio.

7. METODOLOGIA Y RESULTADOS

La metodología descrita a continuación es la que se realizó, para lograr los objetivos planeados. En cada una de las etapas se darán los resultados ya que como es una formulación, la siguiente etapa depende de los resultados de la etapa anterior. Presentando la discusión de los mismos en el apartado correspondiente del presente trabajo.

PRIMERA ETAPA

En ésta se desarrollaron los primeros ensayos para la obtención de un soporte de crecimiento.

La preparación de los medios fué la siguiente; se pesa cada una de las sustancias participantes en la formulación del medio de cultivo, posteriormente son disueltas con la base de pulque correspondiente, ajustando el pH (pH=7), lo más exacto posible, a continuación es calentado a ebullición durante 5 minutos aproximadamente, en seguida es esterilizado en autoclave a 15 libras por 15 minutos, por último es vertido a cada una de las cajas de petri (proximadamente 20 ml).

Los medios elaborados fueron inoculados con diversas cepas puras tales como:

Estafilococos hemolíticos

Proteus vulgaris

Estreptococos hemolíticos

Neisseria sp.

Pseudomona aeruginosa

Clostridium perfringens

Bacteroides sp

Clostridium histolyticum

Escherichia coli

Así también cada uno fué incubado en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Los sistemas para incubación de anaerobiosis fueron:

(#) Jarra con vela (presión parcial de CO_2)

(&) Jarra con Anaerocult A.

1.- El primero de los medios fué constituido de :

Agar-agar	1.5 %	gelificante
NaOH 2N.	2.5ml/50ml	neutralizante
Pulque	47.5 ml	nutriente

2.- El medio No.2, sé varió el porciento de agar-ager.

Agar-agar	1.7%
NaOH 2N.	2.5ml/50ml
Pulque	47.5 ml

3.- Para el medio No. 3, se obtuvieron fracciones de pulque por centrifugación (3000 rpm durante 5 minutos): pulque líquido (sobrenadante) y sedimento de pulque (el cual contiene en mayor proporción células) , ambas fracciones se compararon con el pulque completo, formulandose los siguientes medios.

	(a)	(b)	(c)
Agar-agar	1.7 %	1.7 %	1.7 %
NaOH 2N/50 ml	2,5 ml	2.5 ml	2.5 ml
Pulque (47.5ml)	completo	líquido	sedimento

Cada uno de los medios se realizó ajustando a pH=6 y otra serie fué ajustada a pH=7 y pH=8

Para producir un poco de mayor enriquecimiento se adicionó al medio peptoná de caseina y glucosa, variando la concentración de cada una de ellas, continuando las diversas fracciones del pulque.

<u>Medio No 4</u>	A	B	C	D
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseina	0%	0.5%	1%	1.5%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Pulque completo	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml

<u>Medio No.5</u>	A	B	C	D
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseina	0%	0.5%	1%	1.5%
NaOH 2N/50 ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Pulque líquido	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml
<u>Medio No.6</u>	A	B	C	D
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseina	0%	0.5%	1%	1.5%
NaOH/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Pulque sedimento	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml
<u>Medio No.7</u>	A	B	C	D
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseina	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Glucosa	0%	0.5%	1.0%	2.0%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Pulque completo	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml

<u>Medio No.8</u>	A	B	C	D
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseína	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Glucosa	0%	0.5%	1.0%	2.0%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Pulque líquido	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml

<u>Medio No.9</u>	A	B	C	D
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseína	1%	1%	1%	1%
Glucosa	0%	0.5%	1%	2%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Pulque sedimento	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml

Para determinar que fracción de pulque era mejor a la constitución del medio, se realizaron los mismos medios antes indicados aunando las variables de pulque fresco y pulque refrigerado para ver si la refrigeración afecta las propiedades de éste.

<u>Medio No.10</u>	A	B	C	D
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseína	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Glucosa	0%	0.5%	1.0%	2.0%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Pulque fresco	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml
<u>Medio No.11</u>	A	B	C	D
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseína	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Glucosa	0%	0.5%	1.0%	2.0%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Pulque completo refrigerado	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml
<u>Medio No.12</u>	A	B	C	D
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseína	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Glucosa	0%	0.5%	1%	2%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Pulque líquido fresco	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml

<u>Medio No 13</u>	A	B	C	D
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseína	1.5%	1.5%	1.5%	1.5%
Glucosa	0%	0.5%	1.0%	2.0%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Pulque líquido refrigerado	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml

<u>Medio No. 14</u>	A	B	C	D
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseína	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
Glucosa	0%	0.5%	1.0%	2.0%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml

<u>Medio No.15</u>	A	B	C	D
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseína	1%	1%	1%	1%
Glucosa	0%	0.5%	1%	2%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2,5ml	2,5ml	2.5ml
Pulque sedimento refrigerado	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml

RESULTADOS DE LA PRIMERA ETAPA

Cada uno de los resultados esta dado con respecto al medio que se señala, el cual se describió anteriormente.

Los resultados reportados estan dados con la siguiente relación.

- negativo sin crecimiento
- ± escaso crecimiento
- + bajo crecimiento
- ++ moderado crecimiento
- +++ buen crecimiento
- * medio de cultivo más adecuado

Medio	Consistencia	Cepa	Crecimiento
1	semisólido	-	-
*2	sólido	<u>E.coli</u>	++

Medio No.3

Medio	pH	Cepas	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio
	6	<u>E.coli</u> <u>C.histolyticum</u>	- -	- -
A	*7.	<u>E.coli</u> <u>C.histolyticum</u>	+++ +	+++ ++
	8	<u>E.coli</u> <u>C. histolyticum</u>	++ +	++ ++

Medio	pH	Cepas	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio(#)
B	6	<u>P.aeruginosa</u>	+	-
		<u>E.coli</u>	-	-
		<u>C.histolyticum</u>	-	-
	*7	<u>P.aeruginosa</u>	+++	++
		<u>E.coli</u>	+++	+++
		<u>C.histolyticum</u>	++	+++
	6	<u>P.aeruginosa</u>	++	+
		<u>E.coli</u>	+	+
		<u>C.histolyticum</u>	±	++
C	*7	<u>P.aeruginosa</u>	++	+
		<u>E.coli</u>	+	+
		<u>C.histolyticum</u>	++	+++
	8	<u>P.aeruginosa</u>	+++	++
		<u>E.coli</u>	+++	++
		<u>C.histolyticum</u>	++	++

Al adicionar sustancias de enriquecimiento como fué peptona de caseína y glucosa, una vez de haber seleccionado el pH más adecuado (pH=7) y concentración de Agar-agar (1.7%) los resultados fueron los siguientes:

Medio No.4

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio
A	<u>E.coli</u>	+	+
	<u>C.histolyticum</u>	-	-
*B	<u>E.coli</u>	++	++
	<u>C.histolyticum</u>	-	+
C	<u>E.coli</u>	++	++
	<u>C.histolyticum</u>	++	++
D	<u>E.coli</u>	+	+
	<u>C.histolyticum</u>	-	+

Medio No.5

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio
A	<u>E.coli</u>	+	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	+
*B	<u>E.coli</u>	++	++
	<u>C.histolyticum</u>	++	++
C	<u>E.coli</u>	+	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
D	<u>E.coli</u>	+	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	+

Medio No.6

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio
A	<u>E.coli</u>	+	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
B	<u>E.coli</u>	++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
C	<u>E.coli</u>	++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	+
D	<u>E.coli</u>	++	++
	<u>C.histolyticum</u>	++	+++

Medio No.7

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio
A	<u>E.coli</u>	++	+
	<u>C.histolyticum</u>	++	+
B	<u>E.coli</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	++	++
C	<u>E.coli</u>	++	+++
	<u>C.histolyticum</u>	++	+++
D	<u>E.coli</u>	++	++
	<u>C.histolyticum</u>	++	+++

Medio No.8

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio(#)
A	<u>E.coli</u>	++	++
	<u>C.histolyticum</u>	++	++
*B	<u>E.coli</u>	++	++
	<u>C.histolyticum</u>	++	+++
C	<u>E.coli</u>	++	+
	<u>C.histolyticum</u>	++	++
D	<u>E.coli</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	++	+++

Medio No.9

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio(#)
A	<u>E.coli</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	++	+++
*B	<u>E.coli</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	+++
C	<u>E.coli</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
D	<u>E.coli</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	+++

En la determinación del efecto de refrigeración sobre el pulque y fracción de éste en la formulación del medio de cultivo los resultados son:

Medio No.10

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio (#)
A	<u>E.coli</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
*B	<u>E.coli</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
C	<u>E.coli</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	±	+
D	<u>E.coli</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++

Medio No.11

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio
A	<u>E.coli</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
*B	<u>E.coli</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	±	++
C	<u>E.coli</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
D	<u>E.coli</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++

Medio No.12

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio
A	<u>E.coli</u>	++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
B	<u>E.coli</u>	++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
C	<u>E.coli</u>	++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
D	<u>E.coli</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	++

Medio No.13

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio
A	<u>E.coli</u>	+	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
B	<u>E.coli</u>	++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
C	<u>E.coli</u>	++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
D	<u>E.coli</u>	++	++
	<u>C.histolyticum</u>	++	+++

Medio No.14.

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio
A	<u>E.coli</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
B	<u>E.coli</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
C	<u>E.coli</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
D	<u>E.coli</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	++

Medio No.15

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio(#)
A	<u>E.coli</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	±	+
B	<u>E.coli</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
C	<u>E.coli</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
D	<u>E.coli</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	++

SEGUNDA ETAPA. OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO

En ésta etapa se mejora el medio de cultivo adicionándole agentes reductores, así como modificaciones propias para la optimización.

Los primeros reactivos que se adicionaron en ésta etapa fueron: bisulfito de sodio (NaHSO_3) como agente reductor (variando la concentración de éste), y fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4) como amortiguador , utilizando dos fracciones de pulque, líquida y sedimento.

<u>Medio No.16</u>	I	II	III	IV	V
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseína	1%	1%	1%	1%	1%
Glucosa	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
NaHSO ₃ g/dl	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
Na ₂ HPO ₄ g/50ml	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Sedimento de Pulque	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml

<u>Medio No.17</u>	I	II	III	IV	V
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseína	1%	1%	1%	1%	1%
Glucosa	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
NaHSO ₃ /dl	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
Na ₂ HPO ₄ g/50ml	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
líquido de Pulque	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml	47.5ml

En el siguiente medio se varió la concentración del sedimento de pulque, dado a que éste tiene en su mayoría unidades celulares, la variación de concentración se basó en el número de éstas por mm^3 , centrifugando 200ml de pulque completo, el sedimento obtenido se diluye con 50mg de agua conteniendo 140 000 unidades/ mm^3 , el sedimento de 200ml de pulque completo se diluyen en 100ml de agua y se obtienen 60 000 unidades celulares/ mm^3 , por último el sedimento de 100ml de pulque completo se diluyen con 100ml de agua y se obtienen 30 000 unidades celulares/ mm^3 el conteo celular se realizó por medio de la cámara de Neubauer.

Esta variación de concentración del sedimento se realizó porque se observó un buen desarrollo bacteriano en dicha fracción.

También se cambia el sistema de anaerobiosis, sometiendo los medios de cultivo a una atmósfera anaerobia más estricta, con el sistema de ja-

rra con Anaerocult A, ya que el sistema de anaerobiosis hasta éste momen-
to empleado sólo proporciona una atmósfera parcial de CO_2 , dado que el
objetivo es el desarrollo de bacterias anaerobias estrictas como es el
caso de bacteroides.

<u>Medio No. 18</u>	X	Y	Z
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseína	1%	1%	1%
Glucosa	0.5%	0.5%	0.5%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
NaHSO ₃ g/dl	0.1	0.1	0.1
Na ₂ HPO ₄ g/50ml	0.4	0.4	0.4
Sedimento de Pulque	47.5ml	47.5ml	47.5ml
Contenido de u.celulares/mm ³	140 000	60 000	30 000

Los segundos reactivos que se adicionaron en ésta etapa fueron: un
indicador oxido-reductor; azul de metileno para indicar el grado de re-
ducción del medio y del sistema de anaerobiosis (1.3ml/50ml al 0.58%)
y carbonato de sodio(NaCO₃) al 20% agregando éste último después de di-
solver y esterilizar el medio para crear una pequeña atmósfera de CO_2 .

Medio No.19

Agar-agar	1.7%
Peptona de caseína	1%
Glucosa	0.05%
NaOH 2N/50ml	2.5ml
NaHSO ₃ g/dl	0.1
Na ₂ HPO ₄ g/50ml	0.4
Na ₂ CO ₃ (20%)	0.5ml
Azul de metileno (0.58%)	1.3ml/50ml
Pulque líquido	46.0 ml.

Medio No.20

Agar-agar	1.7%
Peptona de caseína	1%
Glucosa	0.5%
NaOH 2N/50ml	2.5ml
NaHSO ₃ g/dl	0.1
Na ₂ HPO ₄ g/50ml	0.4
Na ₂ CO ₃ (20%)	0.5ml
Azul de metileno (0.58)	1.3ml/50ml
Pulque completo	46.0 ml

Por último se adicionó sangre de carnero en una proporción del 4%, para proporcionar la vitamina K y hemina, sustancias necesarias para el desarrollo de bacteroides (bacterias anaerobias estrictas), también se variaron algunos reactivos para que sean los mínimos necesarios en la formulación .

No.de Medio.	21	22	23	24	25	26
Agar-agar	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%	1.7%
Peptona de caseína	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
NaHSO ₃ g/dl	0.1	0.1	0.1	0.1	---	---
Na ₂ HPO ₄ g/50ml	0.4	--	0.4	--	--	--
Na ₂ CO ₃ (20%)	0.5ml	0.5ml	--	--	--	0.5ml
Sangre de carnero/50ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Pulque completo	45ml	45ml	45ml	45ml	45ml	45ml

Nota: es importante en cada uno de los medios ajustar el pH (pH=7) con la adición de 2.5ml ± de NaOH 2N en cada uno de los medios de cultivo.

Al observar desarrollo bacteriano en cada uno de los medios previamente inoculados se realizaron tinción de Gram para observar características microscópicas de cada cepa inoculada.

Medio No. 16

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio(#)
I	<u>P.aeruginosa</u>	+++ (pigmento)	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
II	<u>P.aeruginosa</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
III	<u>P.aeruginosa</u>	+++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
IV	<u>P.aeruginosa</u>	-	-
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
V	<u>P.aeruginosa</u>	-	-
	<u>C.histolyticum</u>	+	++

Medio No. 17

	Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio
I	<u>P.aeruginosa</u>	+++ (pigmento)	+
	<u>C.histolyticum</u>	++	+++
II	<u>P.aeruginosa</u>	+++	++
	<u>C.histolyticum</u>	+	++
III	<u>P.aeruginosa</u>	++	+
	<u>C.histolyticum</u>	+	+++
IV	<u>P.aeruginosa</u>	-	-
	<u>C.histolyticum</u>	+	+++

V	<u>P.aeruginosa</u>	-	-
	<u>C.histolyticum</u>	++	+++

Dada la variación de la concentración de unidades celulares/mm³ en la fracción sedimento de pulque, los resultados fueron los siguientes:

Medio No.18

	Cepa	Crecimiento aerobio:	Crecimiento anaerobio(&)
X	<u>S.aureus</u>	+++	+
	<u>Clostridium sp</u>	+	++
*Y	<u>S.aureus</u>	+++	+
	<u>Clostridium sp</u>	+	+
Z	<u>S.aureus</u>	+++	+
	<u>Clostridium sp</u>	+	++

De acuerdo a los resultados hasta ésta etapa los medios más favorables para cada caso fueron:

Medio para bacterias aerobias

Medio para bacterias anaerobias

Agar-agar	1.7%	1.7%
Peptona de casefna	1%	1%
Glucosa	0.5%	0.5%
NaOH 2N/50ml	2.5ml	2.5ml
NaHSO ₃ g/dl	0.1	0.1
Na ₂ HPO ₄ g/50ml	0.4	0.4
Pulque 47.5ml	sedimento (60 000 u.c/mm ³)	líquido y completo

En los siguientes medios sólo se utiliza, pulque completo y líquido de pulque.

Medio No.19

Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio
<u>S.aureus</u>	++	+
<u>C.perfringens</u>	+	++
<u>Bacteroides sp</u>	-	-

Medio No.20

Cepa	Crecimiento aerobio	Crecimiento anaerobio
<u>S.aureus</u>	++	++
<u>C.perfringens</u>	+	+++
<u>Bacteroides sp</u>	-	-

Por último, al adicionar sangre de carnero al medio y variando algunos reactivos, los resultados se observan en las tablas siguientes.

CRECIMIENTO AEROBIO

No. Medio	21	22	23	24	*25	26
Cepa						
<u>Neisseria sp</u>	+	±	±	±	+	+
<u>E.coli</u>	+++	±	+++	+++	++	++
<u>Klebsiella sp</u>	+++	±	+++	+++	+++	+++
<u>S.pyogenes</u>	+	±	+	+	++	++
<u>S.aureus</u>	+	+	++	+	++	++
<u>Proteus sp</u>	++	±	++	+++	+++	+++

CRECIMIENTO ANAEROBIO(&)

No. Medio	21	22	23	24	*25	26
Cepa						
<u>Bacteroides sp</u>	+	+	+	+	+++	++
<u>Bacteroides sp</u>	+	+	+	+	++	++
<u>Bacteroides sp</u>	+	±	+	+	++	++
<u>C.perfringens</u>	+	+	+	+	++	++
<u>Neisseria sp</u>	-	+	-	+	++	+

De acuerdo a los resultados anteriores el medio de cultivo formulado queda constituido de la siguiente forma:

Agar-agar	1.7%
Peptona de caseína	0.5%
NaOH 2N/50ml	2.5ml
Sangre de carnero	4%
Pulque completo	47.5ml

TERCERA ETAPA : ESTABILIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO FORMULADO.

Se colocó un lote de 30 cajas de petri con medio de cultivo formulado en refrigeración a 4°C y en bolsas de polietileno, inoculando a diferentes períodos, a lo largo de un mes, empleando cepas aerobias estrictas: P.aeruginosa, aerobios facultativos; Estreptococos hemolíticos, S.aureus, E.coli, y cepas estrictamente anaerobias como Bacteroides, así como anaerobios aerotolerantes; Clostridium sp.

RESULTADOS DE LA TERCERA ETAPA: ESTABILIDAD DEL MEDIO FORMULADO .

Cepa	Crecimiento aerobio
<u>S.pyogenes</u>	++
<u>S.aureus</u>	++
<u>E.coli</u>	+++
<u>P.aeruginosa</u>	+++

Cepa	Crecimiento anaerobio
<u>Clostridium sp</u>	++
<u>Bacteroides sp</u>	+++
<u>Bacteroides sp</u>	++

El crecimiento de las diferentes cepas puras empleadas se mantuvo durante el periodo de estabilidad del medio formulado.

CUARTA ETAPA: REPRODUCTIVIDAD DEL MEDIO FORMULADO.

El medio formulado constituido de:

Agar-agar	1.7%
Peptona de	
- caseína	0.5%
NaOH 2N/50ml	2.5ml ±(apH=7)
Sangre de carnero	4%
Pulque completo	47.5ml

Se elaboró seis veces y se inocularon los mismos microorganismos (Bacteroides sp, Clostridium sp), en las mismas condiciones (37°C, 48 horas de incubación, en sistema de jarra con Anaerocult A), empleando el mismo tipo de pulque.

RESULTADOS DE LA CUARTA ETAPA :REPRODUCTIVIDAD DEL MEDIO FORMULADO.

Cepa	Crecimiento anaerobio
<u>Bacteroides sp</u>	++
<u>Clostridium sp</u>	++

En las seis ocasiones que se elaboró el medio formulado e inoculo con las cepas anaerobias estrictas y aerotolerantes, presentaron resultados similares al expuesto.

QUINTA ETAPA: COMPARACION DEL MEDIO FORMULADO.

El medio de cultivo formulado antes descrito, fué comparado con los siguientes medios de cultivo: Agar sangre, Agar sangre-alcohol feniletílico y el medio anaerobio según Brewer, para observar ventajas y/o desventajas.

RESULTADOS DE LA QUINTA ETAPA.

Debido al factor económico sólo se pudieron comparar por cinco veces ya que los medios comerciales son muy caros así como el reactivo para anaerobiosis (Anaerocult A), obteniéndose los siguientes resultados

Medio	Cepa	Crecimiento anaerobio (&)
Agar sangre	<u>Bacteroides sp</u>	++
	<u>Clostridium sp</u>	++
Agar sangre alcohol fenil- etilico	<u>Bacteroides sp</u>	++
	<u>Clostridium sp</u>	++
Agar Brewer	<u>Bacteroides sp</u>	-
	<u>Clostridium sp</u>	-
Medio Formulado	<u>Bacteroides sp</u>	++
	<u>Clostridium sp</u>	++

en las cinco ocasiones los resultados fueron similares.

9. ANALISIS DE RESULTADOS

En los primeros medios (1,2) se varía la concentración de agar- - agar para obtener la consistencia del medio, de manera que pueda realizarse una inoculación normal, lograndose con 1.7% de agar-agar.

En el medio No. 3 se observó la influencia del pH en el crecimiento bacteriano, produciendose mejores resultados a pH 7 y 8, (dependiendo del pH requerido para la cepa bacteriana inoculada).

A partir del medio No. 4 se consideraron las dos fracciones del - pulque, obtenidas por centrifugación; sedimento y líquido del pulque. Ambas fracciones se compararon con el pulque completo añadiendoseles - peptona de caseína como fuente de proteínas y aminoácidos, obteniendose la concentración adecuada de peptona para el enriquecimiento de cada - una de ellas .Posteriormente se adicionó al medio, un nutriente de fácil asimilación como lo es la glucosa, con lo que se obtuvo un mejor desarrollo bacteriano.

A partir del medio No.10, se comparó el efecto en el crecimiento - bacteriano al utilizar en el medio pulque fresco y almacenado hasta . - tres semanas de refrigeración para conocer si ésta afecta las características del pulque, obteniendose resultados muy similares, por lo que éste factor no influye, siempre y cuando el tiempo de almacenamiento del pulque no supere las tres semanas, ya que después de éste tiempo se inicia la descomposición del pulque por fermentación.

Para optimizar el medio de cultivo, se adicionó un reductor; bisulfito de sodio (NaHSO_3) a diferentes concentraciones; siendo la más adecuada de 0.1g/dl ya que concentraciones mayores inhiben el crecimiento bac

teriano aún de aquellas bacterias que necesitan condiciones reductoras. Dicha sustancia fué probada tanto en la fracción de sedimento de pulque como en la de líquido. De la misma manera se introduce un amortiguador; fosfato ácido de sodio (NaHPO_4) para mantener el pH constante. Después de esterilizar el medio y durante la incubación del mismo. Resultando satisfactoria la concentración de 0.4 g/50 ml de NaHPO_4 .

Dado a que se observó un buen desarrollo bacteriano en la fracción sedimento de pulque, se varió la concentración de éste, probándose; sedimento con un contenido de 140 000 u. celulares/ mm^3 , 60 000 y 30 000 u. celulares/ mm^3 , en el primer caso el desarrollo bacteriano se extiende en gran proporción por lo que no permite un buen aislamiento, en tanto que al usar sedimento con 60 000 u/ mm^3 , resultó ser la concentración más adecuada pues el aislamiento se observó claramente. Sin embargo no es adecuado el uso de la fracción sedimento de pulque para el sistema de incubación anaerobio al ser comparado con líquido de pulque y pulque completo (19,000 u/ mm^3).

Como medio indicador de oxidación-reducción se adicionó azul de metileno al 0.58% (1.3ml/50ml) resultando un buen indicador principalmente para observar las condiciones reductoras durante la incubación anaerobia sólo que posteriormente se suprimió su uso ya que el color que presenta no permite claramente la observación de colonias bacterianas.

También se introdujo carbonato de sodio al 20% (Na_2CO_3) después de disolver y esterilizar el medio de cultivo produciéndose pequeñas cantidades de CO_2 quedándose probablemente atrapadas en el medio al solidi

ficarse, formando una atmósfera de CO_2 elemento favorable para el desarrollo de microorganismos anaerobios, sin embargo no contribuyó en gran proporción al desarrollo de éstos.

Por último se adicionó sangre de carnero en una proporción del 4% ya que las bacterias anaerobias obligadas requieren en su mayoría hemina y vitamina K, elemento que podría tomar de la sangre, observándose un buen desarrollo bacteriano. También se realizaron algunos cambios en la formulación hasta ese momento dada con el fin de observar si algún elemento de la formulación le es más o menos favorable tras la adición de sangre, además de tratar de reducir el número de reactivos, e incluir únicamente los necesarios, observándose efectivamente que algunos elementos son poco desfavorables para el desarrollo bacteriano, de esta forma quedó formulado el medio con los reactivos mínimos necesarios.

La estabilidad del medio se realizó durante un mes observándose resultados satisfactorios, pues dicho período supera aún el establecido para la mayoría de los medios comerciales, que en promedio es de tres semanas. De igual manera la reproductibilidad del medio es considerada aceptable, ya que se observaron resultados muy similares, debiendo aclararse que un cambio de pH mínimo, influye en gran proporción para el crecimiento bacteriano por lo que es necesario ajustar el pH del medio de cultivo (PH=7).

Finalmente el medio de cultivo formulado fué comparado con medios de cultivo comerciales como son ; agar para bacterias anaerobias según Brewer, agar sangre alcohol feniletílico y agar sangre, observándose resultados similares al ser comparados con éste a excepción del medio Brewer que no presentó desarrollo bacteriano probablemente porque el medio se encontraba muy hidratado.

10. CONCLUSIONES

El medio ideal de pulque formulado esta constituido como sigue:

Agar-agar	1.7%
Peptona de caseína	0.5%
NaOH 2N/50ml	2.5ml [±]
Sangre de carnero	4%
Pulque completo	47.5 ml

Los medios de cultivo para bacterias anaerobias no son empleados con mucha frecuencia en laboratorios clínicos, generalmente por el elevado costo de éstos, así como el sistema anaerobio requerido, que en éste caso se recomienda el Anaerocult A por su facilidad de uso y efectividad de reducción.

El medio de pulque formulado podría ayudar en algo a solucionar este problema, dado que éste es un producto económico, de fácil obtención etc. Lo que permite bajar considerablemente el costo, comparandolo con medios como agar sangre y agar sangre alcoholfeniletílico.

No sólo puede ser utilizado como un medio para bacterias anaerobias sino también es considerado un medio de enriquecimiento para el desarrollo de microorganismos exigentes, aunque sería necesario optimizar el medio y probarlo exhaustivamente con muestras clí-

nicas. Este medio fué probado con cepas clínicas de estreptococos hemolíticos sólo que en ocasiones la hemólisis varía sin llegar a conocer la causa de dicha variación. Por lo que podría realizarse un estudio más amplio al respecto.

El empleo de sangre de carnero fué necesaria en la formulación del medio de cultivo pués los microorganismos anaerobios obligados requieren para su desarrollo hemina y vitamina K, elementos que podrian tomar de la sangre.

Dentro de los resultados expuestos se observa que uno de los medios (No.16-1) es excelente para la observación del pigmento característico de la Pseudomona aeruginosa, de tal modo que podría utilizarse como un medio de identificación de dicha bacteria. De igual forma es un medio lo suficientemente enriquecido para el desarrollo de microorganismos que va desde Pseudomonas, que sólo necesitan una pequeña fuente de carbono hasta el desarrollo de Bacteroides (microorganismos exigentes en sus requerimientos nutricionales).

Por otro lado, de acuerdo al estudio realizado con la fracción de sedimento de pulque, está siendo empleada en la formulación de un medio para urocultivo, como tema de tesis en el Laboratorio Central de ENEP "ZARAGOZA".

Por último tanto el medio formulado, como algunos medios expuestos en éste trabajo podrían ser empleados como medios de cultivo comerciales, dando resultados similares uno con respecto de otro. Sin embargo se sugiere que sea probado el medio de cultivo formulado con muestras clínicas con el fin de optimizarlo aún más y poder utilizarlo con toda confiabilidad.

BIBLIOGRAFIA

1. Appelbaum, P. Accuracy and Reproducibility of a Four-hour Method for Anaerobe Identification, *J. Clin Microbiology* 21:894-898 (1985)
2. Baquet, F. Aspectos Científicos Actuales del Pulque en México, Tesis, Instituto de Biología, México, p 20-32 (1967).
3. Calvo, C. Manual de Técnicas de Laboratorio para el análisis de Alimentos, publicación 63, Depto. de Ciencia y Tecnología de Alimentos, México, p 37-49 (1984).
4. George, W. Selective and Differential Medium for Isolation of *Clostridium difficile*, *J. Clin. Microbiology* 9:214-219 (1979).
5. Hernández M. Valor Nutritivo de los Alimentos Mexicanos, 7a edición, Publicaciones de la División de Nutrición Mexicana, p18 (1977)
6. Jawest, E. Microbiología Médica, 11a edición, Ed. El Manual Moderno, México (1985).
7. Killgore, E. Comparison of the anaerobic systems for the isolation of anaerobic bacteria from clinical specimens, *Am J. Clin. Pathol.* 59: 552-559.
8. Koneman, E. Diagnostic Microbiology, 1st edition, J.B. Lippincott

8. Koneman, E. Diagnostic Microbiology, 1st edition, J.B. Lippincott company, Philadelphia, p533-560 (1979).
9. Lennette, E. Microbiología Clínica, 3a edición, Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires, p 480-540 (1982).
- i
10. Lennette, E. Manual of Clinical Microbiology, 4a edition Washington, D.C. United States of America (1985).
11. Mac Faddin. Pruebas Bioquímicas, 4a edición, Ed. Panamericana, México (1975).
12. Marton, G. Balance de Nitrógeno en la elaboración del pulque, tesis, Instituto de Biología, México (1976).
13. Massieu, S. Determination of some essential aminoacidos in several uncooked Mexican Foodstuffs J Nutrition 28 : 293-304 (1970).
14. Martin, R. Practical method for isolation of anaerobic bacteria in the clinical laboratory, Appl. Microbiol. 22:1168-1171.
15. Monroy, M. Valor Nutritivo del Xistle, I.P.N. México p 203 214 (1967).

16. Natalie, O. Comparison of PRAS II, Rap ID ANA, and API 20A System for identification of Anaerobic Bacteria, J. Clin. Microbiology 21: 122-126 (1985).
- 17 Reilly, S. Role possible of the anaerobic bacteria in pharyngitis J. Clin Pathology 42: 32 (1981).
- 18 Osenblatt, B. Comparison of methods for isolation of anaerobic bacteria from clinical specimens. Appl. microbiology 25: 77-85.
- Rose, A. Microbiología Química, 2a edición, Ed. Alhambra Madrid España 1977.
- 20 Veral, A. Manual de Bacteriología Anaeróbica, 1a edición Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires p 11-33 (1978).
21. Youmans, G. Infectología Clínica, 2a edición, Ed. Interamericana México, p 134-145 (1982).
22. Zafarhussain, R. Adaptation of a coculture technique to the minitek anaerobe system, J. Clin Microbiology, 21: 645-646 (1985)