



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE
ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

Carrera Química Farmacéutico Biológica

Estabilidad de una cepa bacteriana mediante el ajuste
de un método de crioconservación

Tesis

Para obtener el título de
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

Rojas Meza Omar Jair

Directora: Dra. Rosalva Rangel Corona.

Asesor: Dr. José Luis Mora Guevara.

Ciudad Universitaria, Cd.Mx., Agosto 2018



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.

“Cada principio es un juicio, cada juicio el resultado de una experiencia y la experiencia solo se consigue a través del ejercicio de los sentidos”

Donatien Alphonse François de Sade

A:

Mis padres Héctor y Zenaida, por siempre creer en mí, por los valores que inculcaron, por enseñarme a nunca rendirme y a luchar por mis sueños, por darme las herramientas para afrontar siempre mis batallas por nutrir mi espíritu, por ser mi guía en este camino que llamamos vida por todo esto y más los amo.

Mi hermano Uriel, porque deseo ser un buen ejemplo para ti, de enseñarte que en la vida cuando tienes un sueño con mucho esfuerzo se cumple, aprovecho para decirte que estoy orgulloso de ti, verte crecer, ser tu hermano has sido un regalo hermoso que me ha dado la vida te amo.

Mi abu Bety y mis tías Lupe y Tita, que con sus enseñanzas y cariño hoy ven a su niño crecer y comenzar una nueva etapa, yo sé que están orgullosas de mi me lo demostraron siempre, las quiero.

A todas las personas que marcaron mi vida, mis hermanos hijos de otros fulanos, Arturo, Carlos, Christian, Sergio, a las personas maravillosas que encontré a lo largo de la carrera, Dino, Karina, Mary, Víctor, a mis amigos del L4 Leo, Edgar, Marco, Sergio, Ana les agradezco.

Dra. Rosalva Dr. Mora, gracias por el apoyo incondicional que me brindaron por más de un año, por ser excelentes docentes porque sin ustedes este momento no hubiera sido posible estaré eternamente agradecido.

Mis sinodales que siempre recibí un trato excelente de su parte y que me apoyaron en mi trabajo, no encuentro palabras para demostrarles mi agradecimiento.

Por último, a las personas que me faltó mencionar, pero dejaron una enseñanza en mí, que en su momento marcaron mi vida y forjaron mi carácter, porque de esa manera hoy me encuentro en este punto en el cual no hay marcha atrás, donde simplemente hay que afrontar con valentía cada uno de los retos futuros no me queda más que decirles que les estaré profundamente agradecido.

Agosto 2018

Omar Jair Rojas Meza

Tabla de contenido

Resumen.....	1
Introducción	2
1.- Marco teórico.....	2
1.1.- Clasificación de las bacterias.....	3
1.1.2.- Clasificación por tamaño y forma	4
1.1.3.- Clasificación por características de tinción de Gram	5
1.2.- Diferencias estructurales en la pared celular en la coloración de Gram	7
1.3.- Componentes de la cubierta celular bacteriana	9
1.3.1.- La membrana citoplasmática	9
1.3.2.- La pared celular	11
1.3.3.- La membrana externa	17
1.4.- Apéndices de las células bacterianas	19
1.5.- Recombinación heteróloga	21
1.6.- Mecanismos de recombinación de las bacterias Gram negativas.	22
2.- Pruebas Bioquímicas	23
2.1.- IMViC.....	25
3.- Características de Escherichia coli XL-1 Blue	29
4.- Métodos de conservación de cepas microbianas	31
4.1.- Método de Sordelli	34
4.2.- Modificación al método de Sordelli	35
5.- Crioprotectores	35
6.- Recomendaciones para la criopreservación	40
7.- Método.....	43
7.1.- Planteamiento del problema	43
7.3.- Hipótesis.....	44
7.4.- Objetivos	44
7.5.- Diseño experimental.....	45
7.6.-Material.....	46
7.7 Procedimiento.....	48

7.8- Resultados.....	62
8.- Análisis de resultados.....	82
Conclusiones	87
Recomendación.....	87
Referencias.....	88

Resumen

Durante mucho tiempo los microorganismos han sido vistos por el hombre como un enemigo, los nuevos conocimientos y tecnología han dado una nueva perspectiva sobre los microorganismos, en este sentido el propósito de la ciencia debe ser el preservar las especies bacterianas en condiciones en las cuales permanezcan estables. La crioconservación se ha convertido en la elección con más ventajas y por ello es necesario considerar diferentes factores que están implicados en este proceso como son: temperatura de conservación, estrés bacteriano, crioconservadores, entre otras. En el laboratorio de Oncología Celular de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza la cepa *E. coli XL-1 Blue LTC* es de gran importancia para desarrollar nuevos estudios en la rama de oncología, por lo que el propósito de este proyecto fue ajustar las condiciones de crioconservación para la cepa. Como resultado del proyecto se ajustó el micro-método utilizando leche descremada como crioconservador a tres diferentes temperaturas - 22, - 70 y - 196°C, demostrando con evidencia experimental que el micro-método el cual se retó a temperaturas extremas conservo la estabilidad bioquímica de la cepa *E. coli XL-1 Blue LTC* durante un periodo de 6 meses a - 196 °C.

Introducción

Una vez que hemos aislado a las bacterias de interés, estas deben de ser caracterizadas mediante ensayos de taxonomía polifásica, además es recomendable resguardarlas para estudios futuros. La preservación de bacterias es un paso muy importante, debido a que las bacterias representan un potencial biotecnológico, así que, si conservamos estos microorganismos estables, resguardamos dicho potencial. Para la conservación de los diferentes microorganismos debemos tomar en cuenta ciertas recomendaciones: se deben evitar posibles contaminaciones durante el proceso de conservación, durante el tiempo que sobrevivan en números elevados y genéticamente estables.

1.- Marco teórico

La microbiología se originó en 1677 cuando Antonie van Leeuwenhoek observó por primera vez los microorganismos con una lente primitiva. Sus cartas a la Sociedad Real de Londres constituyen una crónica de sus primeras observaciones, aunque mantuvo en secreto sus métodos de fabricación de lentes, por lo cual se llevó consigo a la tumba gran parte de la tecnología que desarrolló. Noventa años después, mediante el empleo de lentes compuestas más complicadas, Carolus Linnaeus describió seis especies bacterianas, aunque no estableció una correlación sólida entre la presencia de microbios y la ocurrencia de enfermedades. ¹

En la actualidad la microbiología es una de las de las disciplinas científicas más amplias y diversas. No sólo incluye la bacteriología, biología molecular, inmunología, micología, virología y parasitología, sino que ha dado lugar a la revolución en bioingeniería y genética molecular.¹

1.1.- Clasificación de las bacterias

Una bacteria es un microorganismo unicelular sencillo que, a diferencia de una célula humana carece de organelos intracelulares recubiertos de membrana como, núcleo, aparato de Golgi, retículo endoplásmico o mitocondria. Por tanto, las actividades fundamentales de tipo metabólico y biosintético de la bacteria se efectúan dentro del citoplasma y de la cubierta celular. Como las células de los protozoarios, hongos, plantas, humanos y otros animales constan de núcleos organizados y recubiertos de membrana, estos microorganismos se clasifican como eucariotas (del griego eu, que significa “verdadero” y karyon, “núcleo”). En contraste, las bacterias carecen de núcleo verdadero se clasifican como procariotas (de pro, que significa “antes”). Hay otras diferencias importantes entre las células humanas y bacterianas que van más allá de la presencia o ausencia de un núcleo verdadero. Las bacterias difieren de las eucariotas por la estructura y composición de su envoltura celular, los mecanismos de síntesis proteica, el sitio en que se efectúan las diversas actividades celulares fundamentales, la estructura de los apéndices celulares como los flagelos, y por sus actividades metabólicas. Estas diferencias entre las células humanas y las bacterianas son importantes porque permiten encontrar blancos únicos para la acción de antibióticos y ello asegura que dichos antibióticos tengan toxicidad selectiva.¹

1.2.1.-Clasificación por género y especie

Las bacterias se nombran por su género y especie, tradicionalmente se basan en sus características descriptivas de las bacterias, como su estructura y morfología, sus características de tinción y sus actividades metabólicas. El reciente advenimiento de las avanzadas técnicas de biología molecular transformó la taxonomía en un ejercicio de comparación de los patrones en gel del DNA y el RNA de transferencia (tRNA), de la secuencia genética y de los porcentajes de guanina y citosina en el cromosoma. En algunos casos las bacterias se subdividen en estereotipos o subespecies conforme a los antígenos superficiales, su capacidad para infectarse por bacteriófagos específicos, estados de enfermedad con los cuales se relacionan en forma única o por sus características metabólicas y biosintéticas.¹

1.1.2.- Clasificación por tamaño y forma

Las bacterias son de diversos tamaños y formas: van desde las espiroquetas, que pueden tener hasta 250 pm de longitud, hasta los micoplasmas estéricos, que tienen un diámetro de 0.15 pm y apenas se observan con el microscopio común. La mayor parte de las bacterias de importancia médica corresponde a bastoncillos (bacilos) o esferas (cocos), aunque las hay en forma de espiral (espiroquetas), bastoncillos cortos y gruesos que casi no pueden distinguirse de los cocos (cocobacilos) o con forma de coma, que en realidad son hélices truncas (vibrios). Cuando los bacilos o cocos forman cadenas, se llaman estreptobacilos o estreptococos (del griego streplos, que significa "cadena torcida"). Los grupos de cocos reciben el nombre de

estafilococos (del griego staphylé, “racimo de uvas”); los pares de cocos se conocen como diplococos y las tétradas se llaman sarcinas (del latín sarcina “un paquete”). Con el tiempo las bacterias adoptan tamaño o forma variable al envejecer o conforme el medio ambiente se modifica. Los cultivos de las mismas pueden contener bastones de longitud diversa, que se denominan bacilos pleomorfos. Por último, hay algunas bacterias con morfología poco común. Los microorganismos Caulobacler, por ejemplo, reciben este nombre porque tienen una protuberancia similar a un tallo en un extremo (del latín caulis, “tallo de planta”). Los microorganismos del género Actinomyces poseen apariencia superficial de hongos y forman colonias similares a mohos, llenas de bastoncillos elongados con aspecto de hifas lungales.¹

1.1.3.- Clasificación por características de tinción de Gram

La mayor parte de las bacterias que se obtienen de muestras clínicas se identifican en forma inicial haciéndolas crecer en un cultivo puro o en un medio artificial y después se examina la forma y el color de las mismas mediante la colocación de una muestra del cultivo en un portaobjetos y su tinción. En casi todos los casos el procedimiento inicial clave es la tinción de Gram; Al examinar con una lente de inmersión en aceite las bacterias teñidas, las **Gram positivas** se muestran de color azul o púrpura, pero las **Gram negativas** tienen apariencia roja o rosada. Las muestras teñidas que se toman de cultivos envejecidos de bacterias **Gram positivas** contienen una mezcla de bacterias azules y rosas, se dice que son **Gram variables**. El procedimiento de tinción de Gram permite diferenciar dos principales grupos de bacterias, cuyas cubiertas celulares son muy distintas entre sí.¹

El mecanismo de la tinción de Gram se basa en diferencias de la estructura de la pared celular de las bacterias **Gram negativas** y **Gram positivas**, así como en la forma en que reaccionan frente a diversos reactivos utilizados en la tinción. El principal colorante que se emplea en esta técnica (Cristal violeta) tiñe de color violeta tanto las células **Gram positivas** como las células Gram negativas porque ingresa en el citoplasma de ambos tipos de células. Con el cristal violeta dentro del citoplasma, la aplicación e ingreso al citoplasma de yodo (el mordiente) determina la formación de un complejo con el colorante que no puede atravesar la pared celular debido a su gran tamaño. La aplicación de alcohol deshidrata el peptidoglucano de las células **Gram positivas** y las torna aún más impermeables al complejo cristal violeta-yodo por lo tanto la célula no es capaz de liberar el complejo. En el caso de las células **Gram negativas** el efecto es muy diferente, dado que el alcohol disuelve la membrana externa de las células e incluso crea en la capa de peptidoglucano pequeños orificios a través de los cuales se difunde el cristal violeta -yodo. Como las bacterias Gram negativas se tornan incoloras después del lavado con alcohol, el agregado de safranina (el colorante de contraste) determina que las células adquieran un color rosado. La safranina crea un contraste con el colorante principal (cristal violeta). Si bien la safranina es absorbida tanto por las células **Gram positivas** como por las células **Gram negativas**, el color rosado de este colorante es enmascarado por el colorante violeta más intenso que absorbieron antes las células **Gram positivas**. En cualquier población de células algunas células **Gram positivas** responden como células **Gram negativas**. Estas células en general son inviables. No obstante, existen algunos géneros de bacterias **Gram positivas** que desarrollan una cantidad creciente de células **Gram negativas**

a medida que el cultivo envejece. Los géneros *Bacillus* y *Clostridium* representan ejemplos de este tipo de bacterias y a menudo se describen como **Gram variables**.²⁶

1.2.- Diferencias estructurales en la pared celular en la coloración de Gram

La cubierta de una bacteria es el conjunto de capas integrales que la rodean, llamadas de manera específica membrana celular y pared célula. La bacteria Gram positiva típica tiene una cubierta de dos capas que consta de una pared celular altamente entrecruzada, de capas múltiples y gruesa formada por peptidoglucano. En contraste la bacteria Gram negativa típica tiene una cubierta celular que consta de una membrana citoplasmática, una pared celular delgada y una membrana externa, como una hojuela formada sobre todo por una molécula similar al fosfolípido, que se llama lipopolisacárido. ¹

En la mayoría de las bacterias **Gram positivas** la pared celular está compuesta por varias capas de peptidoglucano que conforman una capa gruesa y rígida, además su pared celular contiene ácidos teicoicos, que están compuesto principalmente por un alcohol (Glicerol o ribitol). y fosfato. Existen dos clases de ácidos teicoicos: el ácido lipoteicoico que abarca toda la capa de peptidoglucano y está unida a la membrana plasmática, y el ácido teicoico mural, que está unido a la capa de peptidoglucano. La carga negativa de los ácidos teicoicos (generada por los grupos fosfato asociados) determina que estos compuestos se unan a los cationes y regulen su movimiento hacia el interior y el exterior de las células.

Estos ácidos también pueden contribuir al desarrollo celular al prevenir la ruptura de la pared celular y reducir el riesgo de lisis. Por último, los ácidos teicoicos son responsables de una gran parte de la especificidad antigénica de la pared celular y en consecuencia permiten la identificación de las bacterias.²⁶

La pared celular de las bacterias **Gram negativas** está compuesta por una capa o por muy pocas capas de peptidoglucano y una membrana externa. El peptidoglucano está unido a lipoproteínas (lípidos unidos a proteínas mediante enlaces covalentes) de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática.²⁶

La pared celular de las bacterias **Gram negativas** no contiene ácidos teicoicos y el hecho de que contenga una escasa cantidad de peptidoglucano aumenta su susceptibilidad a la ruptura mecánica. La membrana externa cumple diversas funciones especializadas, su intensa carga negativa dificulta considerablemente la fagocitosis y la actividad del complemento (lisis de las células e inducción de la fagocitosis), dos componentes de las defensas del huésped. La membrana externa también constituye una barrera que impide el paso de ciertos antibióticos (p. ej., la penicilina), de enzimas digestivas (p. ej., la lisozima), de detergentes, de metales pesados, de sales biliares y de ciertos colorantes. Sin embargo, la membrana externa no impide el paso de todas las sustancias presentes en el medio externo, puesto que las células necesitan nutrientes para sustentar el metabolismo. La permeabilidad de la membrana externa se debe en parte a la presencia de proteínas llamadas porinas, las que forman canales de membrana. Las porinas permiten el

paso de diversas moléculas, como nucleótidos, disacáridos, péptidos, aminoácidos, vitamina B y hierro. ²⁶

El componente LPS de la membrana externa es responsable de dos características importantes de las bacterias **Gram negativas**. En primer lugar, la fracción polisacárida está compuesta por azúcares llamados polisacáridos O que actúan como antígenos y son útiles para diferenciar las distintas especies de bacterias **Gram negativas**. Esta propiedad es similar a la de los ácidos teicoicos en las bacterias **Gram positivas**. En segundo lugar, la porción lipídica del lipopolisacárido, denominada lípido A, se conoce con el nombre de endotoxina y ejerce un efecto tóxico sobre la circulación sanguínea o el aparato digestivo del huésped. ²⁶

1.3.- Componentes de la cubierta celular bacteriana

Para comprender de qué manera interaccionan las bacterias con el medio ambiente, como ocasionan enfermedades y en qué forma trabajan los antibióticos es importante conocer la estructura, la actividad, síntesis y control de las diversas partes bacterianas. Como las bacterias interaccionen con el mundo que las rodea a través de la cubierta celular y las estructuras relacionadas con ella, se examina a detalle cada aparte de dicha cubierta. ¹

1.3.1.- La membrana citoplasmática

Estructura

Las membranas citoplasmáticas de las bacterias Gram positivas y Gram negativas son similares. Cada una de ellas tiene una membrana citoplasmática trilaminar,

formada de proteínas (60-70%), lípidos y fosfolípidos (20-30%), y una pequeña cantidad de carbohidratos. Los fosfolípidos forman una bicapa con los extremos polares orientados hacia al interior de la bicapa de lípidos. ¹

Las principales funciones de la membrana citoplasmática son 1) actuar como barrera osmótica. 2) servir como sitio de permeabilidad selectiva y del transporte mediado por portadores. 3) ser el sitio de actividad de los citocromos y de la generación de fuerza motriz de protones (FMP), 4) sintetizar la pared celular y 5) constituir un sitio para implantación del cromosoma. ¹

Como la membrana citoplásmica es una película de lípidos, forma una barrera osmótica que nada más permite el paso de moléculas más pequeñas que el glicerol para su difusión hacia el citoplasma. El glicerol y las moléculas de mayor tamaño sólo entran al citoplasma ayudadas por permeasas, las cuales son proteínas de transporte muy específicas que abarcan la membrana citoplasmática. Por tanto, dicha membrana es un sitio en que se efectúa la permeabilidad selectiva y el transporte mediado por portadores. ¹

La membrana citoplásmica también es el sitio donde se realiza la síntesis en este lugar se halla implantado el cromosoma único. Las enzimas para biosíntesis de lípidos complejos se encuentran en la membrana citoplásmica, así como las enzimas que sintetizan la pared celular en algunas bacterias la membrana citoplásmica experimenta invaginación para formar mesosomas, los mesosomas que se localizan a lo largo del eje de mayor tamaño de un bacilo se conocen como mesosomas laterales y se considera que participan en la secreción de proteínas

extracelulares. Otros reciben el nombre de mesosomas septales se encuentran en el septo o tabique entre bacterias adyacentes conectadas y se cree que participan en la segregación de copias del cromosoma hacia las células hijas durante la división celular.¹

El periplasma

Sólo las bacterias Gram negativas tienen membrana interna (membrana citoplásmica) y membrana externa, únicamente ellas tienen periplasma. Dicho periplasma es más que un simple espacio entre dos membranas es la antesala del citoplasma, donde los precursores nutricionales y biosintéticos y los antibióticos aguardan antes de penetrar al citoplasma. Las moléculas de gran tamaño que ingresan al periplasma son descompuestas allí en sus partes constituyentes mediante enzimas periplásmicas. Los aminoácidos y monosacáridos resultantes se transportan después al interior del citoplasma por medio de permeasas ubicadas en la membrana citoplásmica dado que el transporte de algunas de estas moléculas es facilitado por proteínas de enlace de alta afinidad y específicas para sustratos que se encuentran en el periplasma, también permite que las bacterias Gram negativas se protejan completamente de la acción de algunos antibióticos ya que concentran un número reducido de moléculas de hidrolasas de antibióticos en este pequeño espacio. Por último, la pared celular de las bacterias Gram negativas se halla por completo en el interior del periplasma.¹

1.3.2.- La pared celular

Características generales

La pared celular bacteriana es un saco que rodea la célula como si fuera una bolsa membranosa, en ocasiones llamado sáculo de mureína, la forma sobre todo de un polisacárido único que recibe el nombre de peptidoglucano, el cual se encuentra en todas las bacterias excepto en los micoplasmas y las bacterias halófilas que viven en medios hipertónicos e hiperosmóticos, la pared celular confiere rigidez a la célula y evita su lisis osmótica. Cuando la pared celular de una bacteria se retira ocurren dos cosas: la bacteria asume forma redonda si es un bastoncillo y experimenta lisis si se coloca en un medio hipotónico. ¹

Constituyentes de la pared celular

Peptidoglucano

1) Estructura. El peptidoglucano está formado por unidades repetidas de disacárido, N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc) dentro de cada unidad del GlcNA, se une con el MurNAc mediante un enlace glucosídico 1,4-beta. Las unidades de GlcNAc-MurNAc también están interconectados por enlaces glucosídicos 1,4-beta y éstos sí se rompen mediante la acción de las lisozimas. ¹

El MurNAc es un GLcNAC al cual se le adiciona un grupo O-lactilo, que está unido a una serie de aminoácidos el péptido MurNAc contiene nuevos aminoácidos, incluso D-alanina y D-glutamato. Las bacterias Gram negativas en general tienen un ácido *meso*-diaminopimélico (*meso*-DAP) como penúltimo aminoácido en el péptido MurNAc, lo mismo que algunas bacterias Gram positivas. El DAP es lisina con un grupo carboxilo adicional. ¹

Cuando el péptido glucano se forma, los disacáridos se enlazan primero de manera lineal a través de enlaces 1,4-beta y después experimentan entrecruzamiento con estos enlaces peptídicos. El entrecruzamiento confiere la fuerza y rigidez a la pared frente a la presión osmótica y permite que el peptidoglucano forme una red en torno a la bacteria. ¹

El sáculo de mureína en las bacterias Gram negativas difiere en forma significativa del que rodea las bacterias Gram positivas, en las bacterias Gram negativas suele haber solo una capa de peptidoglucano, el entrecruzamiento es lateral y los enlaces cruzados siempre se forman entre alanina y DAP. En contraste, las bacterias Gram positivas en general tienen paredes celulares gruesas y presentan hasta 40 capas de peptidoglucano de alto entrecruzamiento, las bacterias Gram positivas varían los sustituyentes de su péptido MurNAc en las posiciones 2 y 3 para facilitar el entrecruzamiento más amplio. Estas variaciones permiten enlaces entrecruzados que difieren de los que se presentan en la pared celular Gram negativa, además una vez que el DAP y la D-alanina se enlacen de manera directa mediante el enlace peptídico, muchas bacterias Gram positivas construyen enlaces cruzados que contienen péptidos intermedios, esto permite que se establezcan enlaces cruzados más prolongados, que incluyan enlaces cruzados entre capas. ¹

El peptidoglucano sirve como ancla para moléculas únicas en las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Unidas a ocasionales grupos 6-hidroxilo sobre unidades GlcNAc en bacterias Gram positivas, se encuentran cadenas de polioles altamente sustituidos que se conoce como ácidos teicoicos. Estos componentes antigénicos de importancia en las bacterias Gram positivas se describen con mayor amplitud

más adelante. Las bacterias Gram negativas no tienen ácidos teicoicos, en lugar de ello, una lipoproteína que se conoce como lipoproteína de Braun se une al grupo carboxílico terminal de alrededor de un décimo de moléculas de DAP, dicha lipoproteína se extiende al interior de la bicapa de lípidos de la membrana externa y ancla la membrana externa a la pared celular. En todas las bacterias Gram negativas examinadas se detecta la lipoproteína de Braun, con excepción de las especies de *Pseudomonas*.¹

2) Síntesis de la pared celular. La síntesis de la pared celular se inicia con la conversión de la fructuosa 6-fosfato en glucosamina 6-fosfato y enseguida se agrega acetilo para transformar la molécula en 6-fosfato de N-acetilglucosamina, después que se cambia de posición el fosfato, la N-acetilglucosamina 1-fosfato se une al difosfato de uridina (UDP). A continuación, se agrega PEP para transformar la molécula en UDP-MurNAc y se suman de manera secuencial aminoácidos individuales del péptido MurNAc al grupo O-láctico. Este proceso da una molécula de pentapéptido de UDP-MurNAc, en la cual el péptido está formado por L-alanina, ácido D-glutámico, L-lisina, D-alanina y D-alanina.¹

En el siguiente paso lo importante es el desplazamiento de monofosfato de uridina (UMP) del UDP-MurNAc-pentapéptido mediante una molécula portadora de 55 carbonos de lípido de isopreno llamada bactoprenol o undecaprenol. El bactoprenol está formado por 11 unidades de isopreno y se halla anclado a la membrana citoplásmica. El dílisio de MurNAc-bactoprenil (MurNAc-P-P-bactoprenol) sirve como cadena principal en la siguiente serie de eventos. Se agrega GlcNAc al MurNAc a través de un enlace glucosídico 1,4-beta y las cinco

glicinas que sirven como puente entre los MurNAc se agregan como cinco glicil-tRNA individuales. Esto da lugar a la unidad fundamental de disacárido que se sumará al sáculo de mureína. El bactoprenol lleva el disacárido a un punto de crecimiento en la pared celular. En este sitio, las enzimas autolíticas (p.ej., las amidasas) acortan el peptidoglucano existente a nueva unidad de disacáridos se agrega al sáculo para formar enlaces glucosídicos 1,4-beta. El portador de difosfato de bactoprenilo se libera y después se desfosforila para dar monofosfato de bactoprenilo, si la desfosforilación del portador no se verifica, la síntesis de la pared celular se detiene porque se carece de portador disponible para aceptar nuevas unidades GlcNAc o MurNAc. Tres antibióticos bloquean la síntesis de la pared celular al interferir con la provisión de fosfato de bactoprenilo, la vancomicina y la ristocetina bloquean la transferencia del disacárido del difosfato de bactoprenilo al sitio de crecimiento de mureína y la bacitracina detiene la desfosforilación del difosfato de bactoprenilo, que es necesaria para regenerar la molécula portadora.¹

En los pasos finales de la síntesis de peptidoglucano cada bacteria tiene una o más transpeptidasas que catalizan la formación de enlaces cruzados en la pared celular. Hay dos D-alaninas al final del péptido MurNAc O-lactilo, el grupo amínico de la glicina terminal en el péptido de enlace cruzado ataca el enlace entre las dos D-alaninas, con ayuda de la transpeptidasa, la D-alanina terminal se desplaza y es reemplazada por un enlace peptídico entre la glicina del enlace cruzado y la penúltima D-alanina. Este enlace cruzado completa la inserción de la unidad de disacárido dentro del sáculo de mureína en expansión. Cada bacteria tiene múltiples tipos de transpeptidasas porque diferentes tipos se emplean para reparar o

extender el sáculo y diversos sitios de la pared (como la punta en la comparación con el lado más prolongado del bacilo) utilizan transpeptidasas también se conocen como proteínas entrelazantes de penicilina (PBP) porque son los principales blancos de los antibióticos lactámicos beta, como penicilinas, cefalosporinas y monobactamas. ¹

3) La pared de la célula bacteriana y las enfermedades. La liberación de las unidades estándar de peptidoglucano durante la infección se relaciona con la actividad patógena. No obstante estudios recientes demostraron que los residuos de MurNAc de algunas bacterias están O-acetilados en el grupo C-6 hidroxilo. Los residuos de MurNAc O-acetilados resisten la acción hidrolítica de la lisozima y las glucosidasas producidas por las células fagocitarias, lo que permite que las bacterias con peptidoglucano O-acetilado resistan la lisis enzimática. El porcentaje de residuos MurNAc O-acetilados varía de 10 a 100% según la especie bacteriana, pero en general es de 30 a 50%. ¹

No se sabe de qué manera los fragmentos de peptidoglucano producen respuestas tan diversas, los efectos como somnolencia y fiebre se atribuyen a la capacidad para estimular la producción de interleucina 1. ¹

Ácidos teicoicos y ácidos lípoteicoicos

1) Estructura de los ácidos teicoicos. La envoltura celular de las bacterias Gram positivas contiene cadenas de hasta 30 fosfatos de glicerol o ribitol entrelazados por enlaces fosfodiéstericos y se extienden desde la cubierta celular hasta el ambiente. Estas cadenas de polioles se llaman ácidos teicoicos, los grupos alcohol de los

ácidos teicoicos están sustituidos con azúcares, por lo que estas moléculas son muy antigénicas. En algunos casos hasta 50% de los complejos de la pared celular es ácido teicoico, los ácidos teicoicos existen en forma de ácidos lipoteicoicos o ácidos teicoitos de la pared. ¹

a) Ácidos lipoteicoicos. Todas las bacterias Gram positivas tienen ácidos teicoicos unidos a los lípidos de la membrana citoplásmica, que atraviesan la pared celular y se atienden hacia el ambiente, estos se llaman ácidos lipoteicoicos y en general están formados por cadenas muy sustituidas de fosfato de glicerol. Los ácidos lipoteicoicos son determinantes antigénicos importantes en algunas bacterias. ¹

Ácidos teicoicos de la pared. Algunas bacterias Gram positivas tienen ácidos teicoicos unidos a grupos ocasionales 6-OH sobre el ácido N-acetilmurámico, estos ácidos teicoicos de la pared no se han estudiado tan a fondo como los ácidos lipoteicoicos. Pero quizá también funcionen como determinantes antigénicos importantes en las bacterias Gram positiva, por ejemplo el carbohidrato C de *S. pneumoniae* es un ácido teicoico de la pared. En la mayor parte de los casos el ácido teicoico de la pared y el ácido lipoteicoico de una misma bacteria carecen de relación estructural. ¹

1.3.3.- La membrana externa

Características generales

Las bacterias Gram negativas son las únicas que tienen una membrana fuera del complejo de la pared celular. Como la membrana citoplasmática, la membrana externa es trilaminar y consta principalmente de los fosfolípidos orientados con los

extremos polares hacia el exterior y las regiones hidrofóbicas en la parte media de la bicapa. Las lipoproteínas flotan en esta bicapa las prolinas y las proteínas similares a prolinas de la membrana externa hacen posible que la membrana sirva como filtro molecular que restringe el acceso de algunas moléculas a la pared celular y a la membrana citoplasmática, solo permite la entrada de las moléculas que pueden atravesar los canales de membrana externa. ¹

En todas las bacterias Gram negativas, excepto en las especies de *Peudomonas*, la membrana externa está anclada a la pared celular por medio de la lipoproteína de Braun. La membrana externa domina las actividades sociales de las bacterias Gram negativas al proporcionar estructuras y receptores que afectan la adherencia a las células huésped, la resistencia a la fagocitosis y la susceptibilidad a los bacteriófagos. El componente clínico más significativo de la membrana externa es una molécula similar a un fosfolípido llamada lipopolisacarido.¹

Constituyentes de la membrana externa

Lipopolisacarido

A diferencia de la membrana citoplasmática, la membrana externa es asimétrica, Es decir, mientras que la hoja interna está formada por fosfolípidos, lipoproteínas y proteínas hidrofóbicas, la hoja externa la conforman sobre todo los canales de membrana que abarcan la membrana externa y una molécula similar a un fosfolípido que tiene actividad farmacológica llamada lipopolisacarido (LPS). ¹

1.4.- Apéndices de las células bacterianas

Las bacterias tienen diversos apéndices que se extienden desde las superficies y llevan a cabo la locomoción o la adherencia a las superficies del huésped, hay dos apéndices celulares proteicos importantes: los flagelos y los pili. Los flagelos son apéndices locomotores, los diversos tipos de pili (fibras) actúan como adhesiones celulares y participan en la transferencia de DNA durante la conjugación o median la resistencia de la fagocitosis. ¹

Flagelos

Casi todas las bacterias con movilidad nadan por que cuentan con filamentos proteicos llamados flagelos que se extienden desde su superficie hacia el medio. Algunas bacterias, como las cepas de Proteus de gran motilidad que forman “enjambres” en el medio de agar, están rodeadas por docenas de flagelos y se dice que son peritricas (lo que significa literalmente, rodeada de cabellos), mientras que otras bacterias tienen mechones de flagelos en ambos polos, un solo mechón en uno de los polos o un solo flagelo en alguno de los polos, las espiroquetas se enrollan en torno a flagelos especializados que se llaman filamentos axiales y se encuentran debajo de una membrana externa.

Estructura de los flagelos

Los flagelos de las bacterias difieren de los que tienen las eucariotas. Los flagelos de eucariotas están formados por tiras de turbulina que siguen un patrón 9+2. En contraste, el filamento de un flagelo bacteriano es una hélice izquierda de unidades repetidas de proteína simplemente llamada flagelina. ¹

En la base del flagelo y la membrana citoplasmática, se encuentran las proteínas que sirven como activador y motor del flagelo. Las proteínas motoras (Mot) actúan como canal que une el paso de protones a través de la membrana citoplasmática con la rotación del flagelo. El flagelo no golpea ni hace ondulaciones; más bien es una hélice rígida que gira como una hélice.¹

Estudios recientes demostraron que una fuerza motriz de protones impulsa de manera directa la rotación del flagelo y que una revolución del flagelo requiere de alrededor de 1000 protones regresen a través de la proteína MotA hacia el citoplasma. Los flagelos de *Escherichia coli* giran hasta 300 veces/seg, este es un proceso muy eficaz algunas bacterias que tienen 1 μm de longitud viajan hasta 200 μm /segundo, esto equivaldría a un hombre de 1.80 m que corriese 366 m/s. O 1316 km/h.¹

Funciones

Las bacterias se desplazan hacia sustancias que se conocen como quimioatrayentes, este fenómeno la quimiotaxis, no ocurre por percepción de un gradiente de quimioatrayentes a través de la superficie de la bacteria por que la superficie bacteriana es demasiado pequeña, la bacteria nada durante un segundo, da vueltas durante 0.1 seg y después nada otro segundo en el sentido que haya reorientado después de girar. Cuando hay quimioatrayentes presentes la bacteria nada más tiempo hacia el atrayente y adquiere un movimiento neto hacia el agente

quioestático. La membrana citoplasmática de la bacteria motil contiene una serie de receptores llamados proteínas de quimiotaxis acetilicas de metilo (MCP), Las MCP tienen un receptor en el periplasma, pueden atravesar la membrana y poseen un módulo ubicado en la cara interna del citoplasma y en contacto con proteínas del interior de la bacteria, por lo menos algunas MCP se enlazan con proteínas de enlace periplásmicas de alta afinidad. Cuando hay un quimiorrepelente presente interactúa con la MCP y afecta su grado de metilación. ¹

1.5.- Recombinación heteróloga

Los genes nuevos se introducen a un replicón mediante la combinación generalizada, recombinación específica en un sitio o recombinación por transposición. ¹

Recombinación generalizada: Este proceso se produce cuando un fragmento del DNA donador contiene una secuencia de polinucleótidos homologa al fragmento de DNA que se encuentra dentro del cromosoma receptor o plásmido. La proteína RecA facilita el intercambio entre sitios recíprocos y da lugar a la formación de un replicón híbrido. ¹

Recombinación específica en un sitio: Este proceso consiste en la introducción de un segmento de DNA que puede insertarse solo en un sitio discreto del replicón receptor, un ejemplo es el bacteriófago lambda que siempre se inserta entre los genes gal y bio de *E. coli*. En lugar de la proteína RecA, dicho proceso utiliza diversos productos genéticos del fago lambda, para que la inserción se verifique se emplea el producto genético lambda int y para que se efectúe la escisión del

fenómeno del fago con respecto al huésped es necesario el uso de los productos genéticos lambda *int* y *xis*.¹

Recombinación por transportación: Mediante este proceso pequeños segmentos genéticos que no son de replicón y se llaman transposones, se desplazan de un sitio a otro sobre un mismo genoma o de un replicón a otro. Los transposones, conocidos también como elementos de transposición o elementos Tn, son segmentos de cadenas dobles de DNA que no pueden replicarse a menos que se encuentren dentro de un replicón uno de los motivos por los que los transposones son importantes es que los genes que codifican las características de virulencia. ¹

La conjugación es un método por el cual se transmite de manera directa el DNA de una bacteria a otra a través de un puente conjugado. Aunque dicho puente aún no se identifica con certidumbre, algunos piensan que es el pilus sexual y otros proponen que es la proteína TraD. obsérvese que el uso del concepto de sexo constituye un antropomorfismo, las bacterias no se aparean en realidad, ni deforman cigotos o experimentan meiosis. ¹

1.6.- Mecanismos de recombinación de las bacterias Gram negativas.

Pocas bacterias Gram negativas se transforman de manera natural. Algunos microorganismos se ven forzados a aceptar DNA cuando se les trata con CaCl₂, pero ésta es una herramienta de laboratorio que se emplea sobre todo en ingeniería genética. ¹

De las bacterias Gram negativas se cree que sólo *Neisseria* y *Haemophilus* experimentan transformación rutinaria y estos microorganismos sólo son

competentes cuando tiene pili. La transformación entre las bacterias Gram negativas no incluye un factor de competencia y es más selectiva que la transformación entre las bacterias Gram positivas. Se reconocen secuencias específicas de oligonuclótidos, de modo que nada más se consume el DNA muy similar. Dicho DNA penetra como fragmentos de doble cadena, las cadenas se enroscan después y sólo se incorpora una de ellas.¹

El experimento de Avery demostró que la transformación permite introducir genes de virulencia o corregir genes de virulencia defectuosos, de modo que una bacteria antes inocua se transforma en peligrosa, los transposones que llevan genes de resistencia a los fármacos también penetran a una bacteria mediante transformación. Por último, la transformación es un proceso muy importante en la ingeniería genética, se induce a las bacterias para que acepten genes eucariotas divididos dentro de plásmidos y como resultado las bacterias transformadas son capaces de sintetizar proteínas humanas.¹

2.- Pruebas Bioquímicas

Fermentación de hidratos de carbono

La fermentación es un proceso metabólico anaerobio de oxidación-reducción, en el cual uno de los sustratos orgánicos actúa como el receptor final de hidrógeno (aceptor de electrones) en lugar de oxígeno. La fermentación de sustratos orgánicos como los hidratos de carbono da como resultado productos finales reducidos y oxidados, los productos finales provenientes de la fermentación de hidratos de carbono dependen de varios factores: a) el microorganismo que lleva a cabo el

proceso de fermentación, b) el sustrato a ser fermentado, c) a veces, factores ambientales como la temperatura y la acidez. Los hidratos de carbono y alcoholes, en conjunto denominados azúcares rinden como pocos productos finales de fermentación: dos gases, hidrogeno y dióxido de carbono, unos pocos ácidos, unos pocos alcoholes y una cetona.²

Las bacterias que fermentan hidratos de carbono por lo general son anaerobias facultativas, los productos finales varían con cada especie bacteriana, lo que depende del sistema enzimático que presente la especie y las condiciones ambientales.²

Los integrantes del grupo coliforme se denominan a menudo fermentadores mixtos de ácidos, fermentadores de ácido fórmico o bacterias colonicas disentéricas (CDT). La fermentación mixta de ácidos es característica de la familia de *Enterobacteriaceae* y estos microorganismos degradan la glucosa en una diversidad de productos finales.²

En otra época los sanitaristas y epidemiólogos utilizaban el acrónimo IMViC (indol, rojo de metilo, Vogues-Proskauer y citrato) para referirse a las pruebas necesarias para detectar la contaminación fecal de los alimentos y el agua. Los funcionarios de salud pública han utilizado muchos años a *Escherichia coli* para indicar la contaminación fecal. Por consiguiente, es necesario un conjunto de características bioquímicas para diferenciar los dos microorganismos. Las pruebas IMViC fueron adaptas para cumplir este objetivo.¹⁰

En vista de la complejidad de diferenciar gran cantidad de especies de enterobacterias, cabe hacer notar que existió una época en la cual las principales decisiones en microbiología eran relativamente simples y se podían tomar sólo sobre la base de cuatro pruebas bioquímicas de fácil realización.¹⁰

2.1.- IMViC

Prueba de Indol

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol (metil indol) y ácido indolacético. Las diversas enzimas intracelulares involucradas se denominan triptofanasas, un término general para designar al sistema completo de enzimas que median la producción de indol por actividad hidrolítica sobre el sustrato de triptófano. El principal intermediario en la degradación de triptófano es el ácido indolpirúvico, el cual puede formar indol por desaminación y también se puede formar escatol por descarboxilación de ácido indolacético.²

Prueba de rojo de metilo

La prueba de rojo de metilo es una prueba cuantitativa basada en el uso de un indicador de pH, el rojo de metilo para determinar la concentración del ion hidrogeno cuando un microorganismo fermenta la glucosa. La concentración de ion hidrógeno depende de la concentración de gases, lo que a su vez es índice de las diferentes vías metabólicas de la glucosa exhibida por los diversos microorganismos. Los diferentes patrones de fermentación a las variaciones en las enzimas relacionadas con el metabolismo del ácido pirúvico en los microorganismos.²

Todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son, por definición fermentadores de glucosa en el caldo RM/ Voges-Proskauer, después de 18-24h de incubación, la fermentación resultante produce derivados metabólicos ácidos, en consecuencia, en un comienzo todos los microorganismos entéricos darán una prueba de rojo de metilo positiva.²

E. coli y otros microorganismos MR-positivos producen una alta cantidad de ácidos por medio de vías metabólicas de fermentación de ácidos mixtos. Los microorganismos RM positivos producen ácidos estables, lo que mantiene la concentración alta de iones hidrogeno. ²

Prueba de movilidad

Las bacterias son móviles por medio de flagelos. Los flagelos aparecen sobre todo en los bacilos (bacterias con forma de bastoncillos): las bacterias móviles pueden contener un único flagelo o varios flagelos y su ubicación varía según la especie bacteriana y las condiciones de cultivo. En ocasiones, las bacterias móviles producen variantes inmóviles que parecen estables y en raras ocasiones revierten a las formas móviles.²

Prueba de Vogues-Proskauer

La prueba de Vogues-Proskauer, se basa en la detección de acetoína, un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa la cual es metabolizada a ácido pirúvico, el principal intermediario de la glucolisis a partir del ácido pirúvico, las

bacterias pueden seguir muchos caminos metabólicos; la producción de acetoina es una de las vías metabólicas de la degradación de la glucosa en las bacterias.²

La prueba Voges-Proskauer (VP) para la acetoina se utiliza para separar *Escherichia coli* de los grupos de *Klbsiella-Enterobacter*, aunque otros miembros de la familia Enterobacteriaceae pueden producir resultado positivo de VP.²

Los fermentadores de ácidos mixtos con posterioridad pueden dividirse en dos grupos: a) los que producen ácidos pero no 2,3- butanodiol, como *E. coli* (VP-) y b) los que producen 2,3- butanodiol como sus principales productos finales, como los grupos de Klensiella-Enterobacter (VP+).²

Prueba de Citrato

La energía puede ser proporcionada a algunas bacterias en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico, por la utilización del citrato como única fuente de carbono. En condiciones normales el metabolismo de citrato involucra una condensación de coenzima A y oxalacetato para ingresar al ciclo de Krebs. El metabolismo del citrato por la mayoría de las bacterias es rápido por la vía del ácido tricarbóxico o el camino metabólico de la fermentación del citrato. Los microorganismos que poseen un mecanismo de transporte o permeasa permiten que el citrato penetre al interior de la célula. En las bacterias el desdoblamiento del citrato involucra un sistema enzimático sin la participación de la coenzima A, la citrasa o el citrato desmolasa. La citrasa requiere un catión divalente para su actividad.²

El medio de fermentación para el citrato también contiene sales de amonio. Un microorganismo que puede utilizar el citrato como su única fuente de carbono también utiliza las sales de amonio como su única fuente de nitrógeno.²

Pruebas en agar con hierro de Kligler/ azúcar triple y hierro

El agar con hierro e Kligler (KIA) y el agar triple azúcar y hierro (TSI) son medios de cultivo diferenciales en un tubo que cumplen un doble propósito: a) la determinación de fermentaciones de hidratos de carbono y b) la determinación de la producción de H₂S. Un microorganismo puede utilizar varios sustratos incorporados en el medio; el patrón de sustratos metabolizados se usa para diferenciar entre los diversos grupos, géneros o especies, principalmente de entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.²

La fermentación tiene lugar tanto en anaerobiosis (en el pico de flauta) como en anaerobiosis (en el fondo). El pico de flauta, el monosacárido glucosa es catabolizado inicialmente por la vía metabólica anaerobia Embden-Meyerhof-Parnas, usada por aerobios y anaerobios para producir el intermediario clave ácido pirúvico.²

Las reacciones del KIA se usan principalmente para identificar a los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.²

Agar EMB (Eosina Azul de Metileno)

El medio de cultivo combina las fórmulas de Holt-Harris y Teague con la de Levine, para obtener un mejor rendimiento en el aislamiento selectivo de enterobacterias y

otras especies de bacilos Gram negativos. Es nutritivo por la presencia de peptona que favorece el desarrollo microbiano, la diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno; éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas, muchas cepas de *Escherichia coli* y *Citrobacter spp* presentan un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras.³

3.- Características de Escherichia coli XL-1 Blue

Las bacterias del género *E. coli* son Gram negativas, tienen forma de bacilo y pertenecen a la familia *Enterobacteraeae*, esta bacteria es un habitante común del intestino de todos los animales, incluyendo el intestino grueso de los humanos. *Escherichia coli* (*E. coli*) es quizás el organismo procarionte más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria unicelular que se encuentra generalmente en los intestinos animales y por ende en las aguas negras. Ésta bacteria es necesaria para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además produce vitaminas B y K y son pocos los serotipos que se asocian con virulencia⁹.

Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram negativo), es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), con dimensiones de 0.5 x 1.9 a 3.0 micras, no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, así como, positiva al indol, descarboxilación de lisina,

fermentación de manitol y gas a partir de la glucosa, citrato negativo. Por ello las pruebas IMViC nos ayudan en gran medida para identificar esta bacteria.⁷

Normalmente cumple una función importante en el cuerpo, suprimiendo el crecimiento de especies dañinas de bacterias así como también sintetizando cantidades apreciables de vitaminas, además posee apéndices filamentosos de naturaleza proteica frecuentemente portadoras de adhesinas, que presentan la propiedad de combinarse con receptores de naturaleza polisacarida localizados en la superficie de las células epiteliales llamados pilis o fimbrias, muchas cepas producen una pequeña microcapsula y muy pocas producen macrocapsulas⁷.

Son pocas las cepas de *E. coli* capaces de causar enfermedades a los humanos a través de diferentes mecanismos entre ellas están las cepas Enteroinvasivas (EIEC) responsables de una forma de la disentería bacilar no obstante, es desconocido aún el tipo de alimentos que pueden hospedar a estas bacterias patogénicas¹⁰.

La cepa *Escherichia coli XL-1 Blue* está diseñada para proporcionar un huésped para la óptima propagación de plásmidos y vectores de fago lambda, entre las características que puede tener esta cepa son la resistencia a antibióticos, así como derivados de episomas de plásmido F, con una clonación eficiente *Escherichia coli XL-1 Blue* es la cepa de elección de muchos experimentos de clonación ya que rescata una sola hebra de fagémido, rescatando así todas las utilidades de los plásmidos y replicando el ADN monocatenario. Se *Escherichia coli XL-1 Blue* cuando se clona cDNA, DNA genómico o también para productos metilados de PCR.¹¹

4.- Métodos de conservación de cepas microbianas

El método de preservación utilizado debe permitir altas viabilidades, prevenir cambios en las características morfológicas y bioquímicas, en la secuencia nucleotídica y en la estabilidad plasmídica de las cepas. La selección de este método depende en gran medida de las disposiciones económicas, posibilidad de obtener cultivos puros y el propósito del laboratorio. ¹³

Como práctica común en muchos laboratorios biotecnológicos se utiliza el almacenamiento de microorganismos desde -20 a -70° C. Los altos niveles de supervivencia alcanzados por este método son de interés tanto desde el punto de vista biofísico como práctico, sin embargo, estos niveles de supervivencia varían entre las diferentes especies y géneros microbianos, por lo que el estudio de la estabilidad a la congelación es un paso obligado de la conservación de cepas microbianas particulares. ¹³

En el caso de los serotipos de *E. coli* los efectos del estado fisiológico del cultivo y su susceptibilidad a la muerte por congelación y descongelación repetida se estudiaron por primera vez por Harrison y colaboradores, quienes informaron que cultivos crecidos aeróbicamente eran más resistentes que los cultivos crecidos en condiciones anaerobias. Derivados de estas observaciones existen diferentes criterios interlaboratorios, en cuanto al tipo y la concentración de criopreservantes, el intervalo de tiempo que se puede establecer para las verificaciones de los bancos, el momento fisiológico para detener el crecimiento del cultivo y el medio de conservación a utilizar. ¹³

Varios métodos se encuentran disponibles para la conservación de microorganismos, cumpliendo con tres objetivos importantes para lograr conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología, los cuales son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; conseguir que al menos el 70-80% de las células se mantengan viables durante este periodo, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método de conservación, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando al menos dos de estos métodos. Estos métodos se pueden resumir agrupándolos en tres categorías, las cuales son: métodos de elección o conservación a largo plazo, métodos alternativos y métodos restringidos.⁴

Existen métodos de conservación variados para los distintos microorganismos y es importante mencionar que ninguno de ellos es universal, por lo que se debe de elegir el método que más se ajuste a los medios técnicos, presupuesto, infraestructura del laboratorio y al microorganismo que se desea preservar. El resguardo de las bacterias puede realizarse de tres formas generales: preservación a corto, mediano y largo plazo, por lo cual es importante mencionar que la forma de preservar a las bacterias ha sido poco explorada y mucho del conocimiento que se tiene recabado en la actualidad se ha obtenido de forma empírica.¹²

Preservación a corto plazo

Esta forma de resguardo se utiliza cuando los laboratorios no tienen un potencial económico suficiente, por ejemplo, no hay un ultracongelador. El método comúnmente usado es la resiembra continua el microorganismo en cuestión se siembra en su medio adecuado y una vez crecido se guarda a 4 °C donde se mantiene unos días para su uso y se vuelve a resembrar en un tiempo no mayor a un mes el gran problema de la resiembra continua de un microorganismo es que se pueden generar mutaciones y adaptación al medio de cultivo, lo que termina generando cepas “domesticadas” cuyo comportamiento ya no representa a la especie inicialmente aislada.¹²

Preservación a mediano plazo

Este es un método que requiere un laboratorio con una infraestructura costosa y el uso de ultracongeladores que conservan a las células a -80 °C. El método conocido como “congelación” ha resultado muy fácil de desarrollar y muchos laboratorios en el mundo lo han elegido por su fácil manejo para preservar microorganismos por congelación, primero se cultiva al microorganismo en cuestión y se deja crecer hasta la fase estacionaria temprana, las células del cultivo se lavan o no con una solución tampón y después son adicionadas con un volumen equivalente de una suspensión que contiene una sustancia que deberá funcionar como protectora de las células a la congelación. Esa sustancia es conocida con el nombre de “crioprotector”.¹²

La preservación adecuada de una cepa bacteriana es necesaria para resguardar el potencial biotecnológico que cada una alberga en su genoma. La disponibilidad de secuencias de genomas completos facilita los estudios de genómica y proteómica,

no obstante, muchos de esos estudios requieren de una colección de mutantes suficiente para establecer la relación inequívoca entre los genes y sus funciones, para identificar regulones y para determinar jerárquicamente los procesos transcripcionales.¹²

Preservación a largo plazo

La preservación a largo plazo de la colección es muy importante y la liofilización es una metodología usada en las colecciones de cultivos microbianos. No obstante, en la actualidad no es la metodología más utilizada para preservar bacterias en la mayoría de los laboratorios.¹²

4.1.- Método de Sordelli

Es un método que fue descrito en el V congreso internacional de Microbiología celebrado en Rio de Janeiro, Soriano (1950) en el que se propuso individualizarlo con el nombre de método de Sordelli, es un procedimiento ideado para conservar cepas microbianas por desecación rápida al vacío, que se disponen con un asa sobre la pared de un tubo pequeño estéril, este tubo pequeño ya tapado a su vez se coloca en el interior de un tubo de ensayo con sílica gel o Cloruro de calcio (CaCl_2) indicador de humedad. Una vez que el tubo pequeño se encuentra dentro del tubo de ensayo este se sella a la flama en forma de ampolleta^{5, 6, 7, 8}

4.2.- Modificación al método de Sordelli

Algunas de las razones que llevaron a la modificación del método fueron la dificultad para adquirir los materiales necesarios para su aplicación, el temor a la disminución de vacío al cabo de algunos años. Prácticamente la única modificación propuesta reside en que cada tubo es utilizado una vez y tiene como ventaja el bajo costo del material para su ejecución. En la técnica modificada el microorganismo se suspende en una gota de coloide protector (suero vacuno, albumina o leche descremada) estéril. Luego se procede como en el método de *Sordelli*, esta técnica permite la conservación de hongos filamentosos y bacterias (más de 10 años).^{5, 6, 7, 8}

5.- Crioprotectores

Para preservar mejor las cepas contra el daño por congelación se emplean diversos agentes crioprotectores estas moléculas mejoran la estabilidad de las cepas al reducir al mínimo el contenido de agua intracelular, evitar la vitrificación y proteger las macromoléculas en el ambiente interno de la célula.¹³

Estos compuestos se han clasificado teniendo en cuenta su permeabilidad a la célula. Los llamados compuestos penetrantes son un grupo de moléculas de alto peso molecular como: dimetil sulfóxido (DMSO), glicerol, metanol y etilenglicol; se aplican generalmente en altas concentraciones (0,5-1,5 M). Otro grupo de compuestos son llamados no penetrantes, donde están: el almidón, el hidroxietílico (HES), la polivinil pirrolidina (PVP), azúcares, proteínas y diferentes moléculas de polietilenglicol que se utilizan a bajas concentraciones (0,01 M).¹³

La leche descremada en concentraciones de 1-10% se ha usado como crioprotector, pero frecuentemente se utiliza para la liofilización, se han hecho estudios con diferentes microorganismos utilizando en combinación leche descremada y algunos otros crioprotectores, se ha encontrado que la leche descremada es efectiva con cepas de *E. coli* a -20 °C. La leche descremada con glicerol es efectiva en bacterias fitopatógenas y hongos.¹⁴

Crioconservadores

Compuesto	Formula	Peso molecular	% para uso
Sulfoxidos			
Dimetilsulfoxido	(CH ₃) ₂ SO	78.13	20-45
Alcoholes y derivados			
Metanol	CH ₃ OH	32.04	2-10
Etanol	C ₂ H ₅ OH	46.07	2-10
Alcohol polivinílico	[CH ₂ CHOH] _x	2-12x 10 ⁴	10
Dioles y derivados			
Etilenglicol	(CH ₂) ₂ (OH) ₂	62.07	2-40
Propilenglicol	CH ₃ CH ₂ CH(OH) ₂	76.09	5-10
Trimetilenglicol	CH ₂ (CH ₂ OH) ₂	76.09	
Dietilenglicol	O(CH ₂) ₄ (OH) ₂	106.12	10
Polietilenglicol	H[OCH ₂ CH ₂] _x OH	2-400x10 ²	5-45

Crioconservadores			
Compuesto	Formula	Peso molecular	% para uso
Polipropilenglicol	$H[OCHCH_3CH_2]_xOH$	$4-40 \times 10^2$	
Polietilenoxido	$(-CH_2CH_2O-)_x$	$3-80 \times 10^5$	5-15
Trioles			
Glicerol	$(CH_2)_2CH(OH)_6$	92.09	5-42
Polialcoholes			
Manitol, sorbitol, dulcitol	$C_6H_8(OH)_6$	182.17	5
Monosacaridos			
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	180.16	1-18
Xylosa	$C_5H_{10}O_5$	150.13	5-10
Disacaridos			
Sucrosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30	1-18
Lactosa, maltosa	$C_{12}H_{22}O_{11} H_2O$	360.30	1-10
Trehalosa	$C_{12}H_{22}O_{11} 2H_2O$	378.33	5-19
Trisacaridos			
Rafinosa	$C_{18}H_{31}O_{16} 5H_2O$	594.52	5
Polisacaridos			
Destroxa, manosa	$[C_6H_{10}O_5]_x$	$1-200 \times 10^4$	5-15
Dextrina	$[C_6H_{10}O_5]_x H_2O$		5-10

Crioconservadores			
Compuesto	Formula	Peso molecular	% para uso
Hidroxietil almidón			2.5-25
Ficol		7-40 x10 ⁴	5-7.5
Goma arabiga		25 x10 ⁵	2-10
Amidas, N-alquilamidas, imidas			
Acetamida	NH ₂ COCH ₃	59.07	10
Metilamida	CH ₃ NH ₂ COCH ₃	73.09	0.5-2
Dimetilfromamida	(CH ₃) ₂ NCOH	73.09	
Dimetilacetalamida	(CH ₃) ₂ NCOHCH ₃	87.12	
Succinimida	NH(CO ₂)(CH ₂) ₂	99.09	1.3
Compuestos heterocíclicos			
Metilpirrolidona	CH ₃ N(CH ₂) ₃ CO	99.13	20-45
Polivinilpirrolidona	[CHN(CH ₂) ₄ CO] _x	3-36 x10 ⁴	2-20
Aminoácidos y ácidos carbónicos			
Prolina	(CH ₂) ₃ NHCHCOOH	115.13	
Glicina	CH ₂ NH ₂ COOH	75.07	
Ácido glutámico	(CH ₂) ₃ NH ₂ CH(COOH) ₂	147.13	1-5
Ácido aminobutírico	(CH ₂) ₃ NH ₂ COOH	103.12	

Crioconservadores			
Compuesto	Formula	Peso molecular	% para uso
Ácido glutárico	$(CH_2)_3(COOH)_2$	132.12	
Acetato de amonio	CH_3COONH_4	77.08	0.1
EDTA	$(CH_2)_2N_2(CH_2COOH)_4$	292.24	
Proteínas, péptidos, polipéptidos y glicoproteínas			
Suero, albumina, gelatina, peptonas			10-20
			0.1-4
Glicoproteínas, mucina	$C_{54}H_{90}N_6O_{18}$	1111.33	
Valinomicina	$C_{60}H_{92}N_{12}O_{10}$	1141.46	
Gramicidina			
Sustratos complejos			
Extracto de levadura			0.25-5
Extracto de malta			0.5-20
Leche descremada			1-10
Miel			10
Surfactantes no aniónicos			
Tween 80		1309.68	
Tritón, macrociclón			

Tabla 1 ¹⁴

6.- Recomendaciones para la criopreservación

La Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) utiliza preferentemente el DMSO como criopreservante, mientras que la compañía New England Biolabs (NEB) propone 50% de glicerol cuando se conserva a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.¹³

La ICH (International Conference on Harmonisation) recomienda que las células animales en medios que contienen un crioprotector se congelen en los recipientes sellados bajo condiciones definidas y controladas, y luego se transfieren al almacenamiento en fase vapor o líquida de nitrógeno líquido o a temperaturas ultra bajas equivalentes. Otros métodos de conservación y almacenamiento pueden ser adecuados dependiendo del organismo utilizado, pero deben ser capaces de mantener un nivel de viabilidad celular tras la reconstitución, que sea consistente y adecuado para el uso en la producción.¹⁵

La OMS en Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Publica en el Mundo en Desarrollo establece que: La mejor manera de almacenar aislamientos bacterianos a largo plazo es liofilización o por congelación. Los métodos específicos apropiados para las bacterias tratadas en este manual se incluyen más adelante en este apéndice. La liofilización (secado por congelación) es el método más conveniente de almacenamiento, debido a que las bacterias liofilizadas pueden almacenarse por largos períodos a 4°C o -20°C y transportarse sin refrigeración, sin embargo, el equipo requerido es caro y no todos los laboratorios tendrán la posibilidad de liofilizar los aislamientos. (Los laboratorios de referencia que elijan liofilizar las bacterias, siempre deben mantener una

preparación congelada además de cantidades más grande de cepas liofilizadas, porque es posible que algunas preparaciones liofilizadas no sean viables cuando sean reconstituidas.) Los cultivos bacterianos se pueden almacenar congelados o liofilizados en diversos medios de suspensión formulados para ese propósito. Hay muchas fórmulas para medios de suspensión, pero en general se utilizan para liofilización los medios con base de suero, leche descremada o medio de polivinilpirrolidona (PVP), y para congelación, la leche descremada, sangre o un caldo rico en tampón (*buffer*) de triptona soya (BTS) con 15%–20% de glicerol grado reactivo. **Por seguridad no debe utilizarse sangre humana** (transmisión de VIH y hepatitis); otra razón es la posibilidad de inhibición del crecimiento de los aislamientos por anticuerpos o por residuos de antibióticos.²⁴

Debe confirmarse que los cultivos que se prepararán para almacenamiento permanente o de corto plazo son puros antes de proceder con cualquiera de estos métodos. Se debe utilizar cultivos frescos (de crecimiento durante toda la noche) para la preparación de las cepas que se van a almacenar.²⁴

En la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos en el capítulo titulado “Conservación, mantenimiento y manejo de cultivos microbianos de referencia: Sistema Lote Semilla”. Menciona lo siguiente: el manejo y almacenamiento de cultivos de referencia en el laboratorio debe efectuarse de tal forma que se reduzca la posibilidad de variaciones genotípicas y fenotípicas, así como el riesgo de contaminación por lo tanto se recomienda el sistema lote semilla para el mantenimiento de cultivos de referencia el sistema de lote semilla, es un método

sencillo y práctico que reduce al mínimo el número de pases de los cultivos de referencia.²¹

La Norma Oficial Mexicana 059 Buenas prácticas de fabricación de medicamentos recomienda lo siguiente para bancos celulares.

Las especificaciones de los insumos empleados para la preparación de los bancos celulares maestro y de trabajo, deben incluir su fuente, origen y los controles necesarios para asegurar que son adecuados para su uso.²²

Debe documentarse el origen de los bancos celulares, la construcción del sistema vector-hospedero para la proteína de interés, contarse con la caracterización del genotipo y fenotipo y el número de pases celulares que garantizan la estabilidad bajo las condiciones evaluadas. El origen y pase celular del lote semilla maestro y de trabajo debe ser documentado.²²

Algunos de los parámetros a considerar son la retención del segmento genético de interés y la pureza, mediante controles que demuestren que están libres de agentes microbianos adventicios y de otros contaminantes celulares ajenos al cultivo objeto.²²

Se deben conservar los registros de uso de los viales de los bancos celulares maestro y de trabajo y de las condiciones para su almacenamiento.²²

Los bancos celulares y/o lotes semilla deben ser mantenidos de forma separada de otros materiales biológicos, bajo condiciones de almacenamiento diseñadas con el objetivo de mantener su viabilidad y evitar su contaminación.²²

Los contenedores de almacenamiento de los bancos celulares y/o lotes semilla deben estar cerrados herméticamente, etiquetados y mantenidos a la temperatura establecida. La temperatura de almacenamiento debe ser registrada de forma continua. Se debe registrar cualquier desviación de los límites establecidos y toda medida correctiva que se tome, así como contar con un plan de contingencia en caso de falla de los sistemas de criopreservación.²²

Se debe contar con un procedimiento que asegure el control de uso, manejo y mantenimiento de los bancos celulares y/o lotes semilla.²²

7.- Método

7.1.- Planteamiento del problema

La congelación es un método físico en el cual se combina temperaturas bajas frenando el proceso de envejecimiento y el uso de un agente de origen natural o sintético (crioconservador) para estabilizar los componentes macromoleculares de los microorganismos o bien para reducir el contenido de agua en el medio evitando la formación de cristales de agua y protegerlos de algún daño, si ambos factores se combinan correctamente en el desarrollo de un método de crioconservación, este permitirá mantener intactas las características genotípicas de los microorganismos, debido a su fácil aplicación y bajo costo, la crioconservación es uno de los métodos de mayor uso y por lo tanto de los más estudiados para la conservación de cepas bacterianas de interés. En el laboratorio de Oncología Celular de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza la cepa *E. coli XL-1 Blue LTC* es de gran importancia para el desarrollo experimental del laboratorio, por ello

con el presente trabajo se establecieron condiciones de almacenamiento de dicha cepa, preservando su integridad bioquímica así la cepa puede ser usada en estudios posteriores de investigación, entonces la propuesta de este trabajo es almacenar la cepa *E. coli XL-1 Blue LTC* podremos mantenerla estable y utilizarla en investigaciones posteriores.

Por lo que este trabajo pretende evaluar la estabilidad de la cepa *E. coli XL-1 Blue LTC* a tres temperaturas que son -22, -70 y -196° C.

7.3.- Hipótesis

La leche descremada ha sido utilizada como criopreservador a la temperatura de -22 °C dando resultados satisfactorios, por ello se propone retar dicho criopreservador a -22°, -70° y -196 °C y se espera que funcione adecuadamente.

7.4.- Objetivos

General

- Evaluar la estabilidad de la cepa transformada *E. coli XL-1 blue LTC* a -22°, -70° y -196°C por el método de crioconservación, con el propósito de mantener integras las características bioquímicas de la cepa.

Específicos

- Realizar las pruebas bioquímicas a la cepa *E. coli XL-1 blue LTC*, para la caracterización de la cepa y observar el comportamiento bioquímico.

- Realizar el método Zaragoza para el almacenamiento de la cepa *E. coli XL-1 Blue LTC*.
- Almacenar la cepa a -22°, -70° y -196° C y así establecer la mejor temperatura para mantener la estabilidad bioquímica de la cepa.
- Realizar las pruebas bioquímicas al final del estudio con el propósito de comprobar la estabilidad bioquímica de la cepa.

7.5.- Diseño experimental.

Tipo de estudio: Se realizó un estudio experimental y prospectivo.

Población de estudio: *Escherichia coli XL1 Blue LTC*, la cual ha sido modificada y no presenta las características tradicionales de una cepa *E. coli* las cuales fueron:

- ❖ Fermentación lenta de lactosa (Agar EMB).
- ❖ Fermentación de carbohidratos en caldo rojo de fenol sin producción de gas (Lactosa, glucosa y sacarosa).

Criterios de inclusión: Cepa pura y bioquímicamente estable.

Criterios de exclusión: Cepa contaminada, baja carga microbiana, cepa bioquímicamente inestable.

Variables:

Dependientes: Cepa bacteriana *E. coli XL-1 Blue LTC*.

Independientes: Temperatura, criocervador, tiempo de conservación.

7.6.-Material.

- ❖ Mechero Fisher.
- ❖ Tubos de ensaye 13 x 100 con tapón de rosca. Pyrex.
- ❖ Tubos de ensaye de 16 x 150 con tapón de rosca. Pyrex.
- ❖ Gradilla metálica.
- ❖ Pipeta Powerpette JENCONS.
- ❖ Cajas Petri. Pyrex.
- ❖ Asa bacteriológica.
- ❖ Lápiz punta diamante.
- ❖ Algodón.
- ❖ Gasa.
- ❖ Papel Kraft.
- ❖ Pinzas de disección.
- ❖ Puntas para micropipeta.
- ❖ Criotubos.
- ❖ Marcador indeleble.
- ❖ Matraz Erlenmeyer. Pyrex.
- ❖ Celdas para espectrofotómetro.
- ❖ Portaobjetos.
- ❖ Tanque de nitrógeno líquido.

Equipo

- ❖ Olla de presión.
- ❖ Incubadora 37 °C ± 2 °C. SHEL LAB.
- ❖ Microscopio. PRIMO STAR ZEISS.
- ❖ Balanza digital. Explorer PRO.
- ❖ Congelador -20 °C. Tor Rey
- ❖ Ultra congelador -70 °C. Thermo Scientific.
- ❖ Espectrofotómetro. Thermo Scientific SPECTRONIC 20+.

Medios de cultivo.

- ❖ Caldo Soya-Trypticaseína. Marca BD Bioxon
- ❖ Caldo RM/VP. Marca DIBICO
- ❖ Agar EMB. Marca BD Bioxon
- ❖ Caldo nutritivo. Marca DIBICO
- ❖ Extracto de carne. Marca BD Bioxon
- ❖ Medio Citrato de Simons. Marca BD Bioxon
- ❖ Agar KIA. Marca DIFCO
- ❖ Agar LIA. Marca BD Bioxon
- ❖ Agar. Marca DIBICO

Reactivos

- ❖ Aceite mineral.
- ❖ Solución salina inyectable 0.9%. Marca PiSA
- ❖ Cristal Violeta. Marca Hycel

- ❖ Safranina. Marca Mikroskopie Meria
- ❖ Lugo. Marca Golden Bell
- ❖ Solución Alcohol-Yodo.
- ❖ Hipoclorito de sodio.
- ❖ Leche descremada. Marca SVELTY.
- ❖ Sacarosa. Marca GIICR
- ❖ Lactosa. Marca BD Bioxon
- ❖ Glucosa. Marca J. T. Baker
- ❖ Reactivo de Kovac's Marca Delta Diagnosticos
- ❖ α -Naftol. Sigma-Aldrich
- ❖ Hidróxido de sodio. Marca Merk
- ❖ Cloruro de sodio. Marca Merk
- ❖ Rojo de fenol. Marca Técnica química SA

Cepa

- ❖ *Escherichia coli XL1 Blue LTC*.

7.7 Procedimiento

7.7.1. Reactivación en caldo nutritivo de la cepa *E. coli XL-1 blue LTC*,
incubar por 24 horas.

7.7.1.1. Realizar lectura de morfología microscópica
realizando una tinción de Gram.

7.7.1.2. Tomar un inóculo del caldo con asa bacteriana esterilizada y resembrar por agotamiento en tubo inclinado de agar Soya-Trypticaseína.

7.7.2. Método de criopreservación.

7.7.2.1. Ajustar la carga de microorganismos mediante la técnica de Mc Farland.

7.7.2.2. Medir 3 mL de Solución inyectable estéril (0.9%) con una Jeringa y pasarlos al tubo inclinado de Agar Soya-Trypticaseína BD BBL inoculado con la cepa E. Coli XL-1 Blue LTC y agitar hasta obtener una suspensión turbia.

7.7.2.3. Pasar esta suspensión a una celda estéril para espectrofotómetro y comparar visualmente con el tubo 8 de Mc Farland (2.4×10^9 UFC), en caso de estar más turbia la suspensión resultante, agregar solución inyectable estéril (0.9% Laboratorio PISA) suficiente para obtener una turbidez igual al tubo 8 del nefelómetro. Posteriormente realizar un segundo ajuste en el espectrofotómetro entre 3 y 7 de transmitancia; y una vez ajustada la solución pasarla a un tubo de ensaye 13 x 100 con tapa de rosca estéril, almacenar a 4° C hasta su uso.

7.7.3. Preparación y esterilización del crioprotector leche descremada Svelty mediante calor húmedo a presión

7.7.3.1. Preparar 10 mL leche descremada al 30%, agregar 3 g de leche descremada Svelty en polvo en un tubo con tapa de rosca y diluir en 10 mL de agua destilada.

7.7.3.2. Cerrar el tubo sin dar toda la cuerda al tapa y esterilizar a 121° C 15 lb de presión por 10 minutos en autoclave.

7.7.4. Preparación de la cepa para el almacenamiento y conservación.

7.7.4.1. Tomar una muestra de 0.5 mL de la solución ajustada del punto 7.7.2. con una Micropipeta (BioHit Proline) y depositarla en un criotubo estéril de 2 mL con tapa de rosca que contengan 1.5 mL de leche descremada estéril al 30%, tapar, agitar y rotular. Repetir tres veces este paso, realizar asepsia con solución de alcohol-yodo Lymphoprep AXIS-SHIELD PoC. dentro de la campana de extracción en una superficie de aproximadamente 30 cm², colocar el mechero en el centro del área limpia, encenderlo y colocar los criotubos a no más de 10 cm de separación del mechero hasta su uso.

- 7.7.4.2. Llenar a una tercera parte de cada tubo capilar Corning® estéril cerca del mechero en una zona limpia con la suspensión del paso anterior, sellar a la flama el tubo capilar por ambos extremos, repetir hasta llenar y sellar 200 tubos.
- 7.7.4.3. Colocar 15 tubos capilares en un tubo NUNC de 15 mL, tapar el tubo y rotularlo, repetir este paso por triplicado.
- 7.7.4.4. Tomar un tubo NUNC rotulado del paso anterior y colocarlo en el congelador de a temperatura de $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Repetir este paso colocando un tubo en el ultracogelador a temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en el tanque de nitrógeno líquido.

7.7.5. Prueba de viabilidad al tiempo 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 meses.

- 7.7.5.1. Descongelar los tubos capilares de las tres diferentes temperaturas ($-22\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en nitrógeno líquido).

Temperatura de -22°C

- 7.7.5.2. Tomar el tubo capilar del reservorio que se encuentra en el congelador.

7.7.5.3. Colocar el tubo capilar en hielo para evitar choque térmico y reducción de carga bacteriana.

Temperatura de -70 °C

7.7.5.4. Tomar el tubo capilar del reservorio que se encuentra en el ultracongelador.

7.7.5.5. Colocar el tubo capilar en hielo para evitar choque térmico y reducción de carga bacteriana.

Temperatura de – 196 °C (nitrógeno líquido)

7.7.5.6. Usar el equipo de protección personal adecuado (guantes de asbesto para bajas temperaturas y zapato cerrado), tomar un tubo capilar del reservorio que se encuentra en el tanque de nitrógeno.

7.7.5.7. Dejar el tubo capilar en el reservorio a temperatura ambiente por 1 minuto para evitar cambios bruscos de presión y prevenir que el tubo capilar se rompa.

7.7.5.8. Colocar el tubo capilar en hielo para evitar choque térmico y reducción de carga bacteriana.

Nota: Antes de reactivar la cepa, no mantener por más de 10 minutos los tubos capilares a temperatura ambiente.



Almacenamiento
de cepas (-22,-70
y -196°C)



Limpieza del
capilar



Marcar corte con
lápiz diamante

Diagrama de flujo 7.7.5. 1



Corte del
extremo del
capilar



Deposito del
inoculo en caldo
Soya
Trypticaseina



Incubar a 37 °C

Diagrama de flujo 7.7.5. 2

- 7.7.5.9. Limpiar los extremos del tubo capilar con una torunda impregnada de solución alcohol-yodo Lymphoprep AXIS-SHIELD PoC. AS.
- 7.7.5.10. Marcar los extremos del tubo capilar con un lápiz punta diamante y romper por los extremos del tubo con unas pinzas flameadas, inocular su contenido en 10 mL de Caldo Soya-Trypticaseína BD BBL de un solo golpe, tapar, agitar e incubar a 37° C por 24 h.
- 7.7.5.11. Posterior a las 24 h de incubación tomar una alícuota de 45 µL del caldo Soya- Trypticaseína del paso anterior con una pipeta Powerpette JENCONS colocar la alícuota en una caja Petri estéril Pyrex.
- 7.7.5.12. Agregar enseguida 15 mL de Agar Soya-Trypticaseína estéril a 45 °C en la misma caja petri y homogenizar. Dejar solidificar e incubar a 37 °C por 24 h.
- 7.7.5.13. Realizar lectura de morfología colonial y microscópica a las 24 y 48 h de incubación.

Nota: La prueba de viabilidad al tiempo 0 se realizó el mismo día que se llenan y sellan los tubos capilares.

7.7.6. Coloración de Gram:

- 7.7.6.1. Se toma una pequeña porción de inóculo con un asa de platino previamente esterilizada, se coloca en un portaobjetos.
- 7.7.6.2. Fijar la preparación a la flama.
- 7.7.6.3. Realizar la tinción de Gram.
- 7.7.6.4. Cubrir la porta objetos de cristal violeta y dejar por un minuto.
- 7.7.6.5. Lavar la laminilla con abundante agua.
- 7.7.6.6. Cubrir la muestra de Lugol y dejar por 1 minuto.
- 7.7.6.7. Lavar la laminilla con abundante agua.
- 7.7.6.8. Agregar solución Alcohol-Acetona hasta que desaparezca el color.
- 7.7.6.9. Agregar safranina por 30 segundos.
- 7.7.6.10. Visualizar con el lente de inmersión 100x del microscopio de luz y reportar.

7.7.7. Prueba de fermentación de hidratos de carbono

Principio: Determinar la capacidad de un microorganismo para fermentar (Degradar) un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal y producir ácido o ácido con gas visible.

- 7.7.7.1. Suspender 1.5 g del medio Caldo Rojo de Fenol (CRF) en 100 mL de agua destilada y disolver en el caldo 0.5 g del hidrato de carbono que se evaluará.
- 7.7.7.2. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución.

- 7.7.7.3. Dispensar en tubos de ensaye (con campana de Durham si se requiere), tapar y esterilizar en hoyo de presión a 121° C durante 15 minutos.
- 7.7.7.4. Inocular el CRF con una gota de la suspensión bacteriana.
- 7.7.7.5. Incubar a 37 °C durante 24 h.
- 7.7.7.6. Examinar los tubos para evaluar crecimiento, producción de ácido y producción de gas.

Interpretación.

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

7.7.8. Prueba de Sulfuro-Indol- Motilidad (SIM)

Ácido sulfhídrico.

Principio: En presencia de tiosulfato en el medio o la degradación de proteína liberando aminoácidos azufrados, algunos microorganismos forman H₂S gaseoso por medio de las enzimas sulfato reductasa y cisteína desulfurilasa. El gas Inoloro reacciona con el citrato de amonio férrico para producir un precipitado negro insoluble de sulfuro ferroso.

Prueba de Indol.

Principio: Determinar la capacidad de un microorganismo para separar indol a partir de Triptofano

Prueba de motilidad.

Principio: Permite determinar la capacidad o incapacidad de movimiento por parte de un microorganismo.

Motilidad

7.7.8.1. A partir de un cultivo, sembrar por punción profunda en medio semisólido con aguja de inoculación recta (no usar asa con anillo). Se debe inocular el centro del tubo, y la punción debe abarcar 2 tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie. Es importante que la siembra se realice en línea recta.

7.7.8.2. Incubar durante 24 h, a 37 °C, en aerobiosis.

Interpretación.

Cepas móviles: Producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra.

Cepas inmóviles: El crecimiento se observa solamente en la línea de siembra.

Sulfuro

Omar Jair Rojas Meza

7.7.8.3. A partir de un cultivo, sembrar con un asa un inoculo en medio SIM.

7.7.8.4. Incubar durante 24 h a 37 °C en aerobiosis.

Cepas H₂S positivas: Ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio.

Cepas H₂S negativas: El medio permanece sin cambio de color.

Indol

7.7.8.5. A partir de un cultivo, sembrar con un asa un inoculo en medio SIM.

7.7.8.6. Incubar durante 24 h a 37 °C en aerobiosis.

7.7.8.7. Pasadas las 24 h tomar el tubo y agregar de 2 a 5 gotas de reactivo de Kovac's y dejar reposar un minuto.

Cepas indol positivas: Desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovac's .

Cepas indol negativas: Sin cambio de color.

7.7.9. Prueba en caldo RM/VP (Rojo de metilo / Voges-Proskauer)

Rojo de Metilo

Principio: Probar la capacidad del microorganismo para producir y mantener estables los productos finales ácidos a partir de la fermentación de la glucosa y para vencer la capacidad buffer de sistema.

Voges-Proskauer

Principio: Determinar la capacidad de algunos microorganismos para producir un producto final neutro (acetoína), a partir de la fermentación de glucosa.

7.7.9.1. A partir de un cultivo tomar una muestra y sembrar en tubos con 5 mL de caldo RM/VP.

7.7.9.2. Incubar a 37° C en aerobiosis por 48 h.

Para Rojo de metilo

7.7.9.3. Agregar 3 gotas del indicador de pH Rojo de metilo antes de interpretar.

Interpretación

MR positivo: El cultivo es lo suficientemente ácido para permitir que el reactivo permanezca con un color distintivo rojo brillante, en la superficie del medio.

MR negativo: Color amarillo en la superficie del medio.

Para Voges-Proskauer.

7.7.9.4. Agregar 6 gotas de reactivo α -Naftol al 5%

7.7.9.5. Agregar 2 gotas de KOH al 40%

Interpretación

VP positivo: Color rosado-rojo en la superficie del medio.

VP negativo: Color amarillo en la superficie del medio. Puede formarse un color cobrizo, pero es negativo.

7.7.10. Prueba de citrato

Principio: Determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento con alcalinidad resultante.

7.7.10.1. A partir de un cultivo tomar una azada y sembrar por estría cruzada en los tubos en pico de flauta.

7.7.10.2. Incubar 24 h a 37 °C en aerobiosis.

Interpretación

Positivo: Crecimiento con un intenso color azul intenso.

Negativo: Ausencia de crecimiento y ningún cambio en el color en el medio .

7.7.11. Agar de Kliger

Principio: Determinar la capacidad de un microorganismo para atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de desarrollo basal, con producción de gas o sin ella, junto con la determinación de la posible producción de ácido sulfúrico (H₂S).

7.7.11.1. A partir de un cultivo tomar una azada y sembrar por estría cruzada con punción en los tubos en pico de flauta.

Interpretación

Utilización de los hidratos de carbono

Solo fermentación de la glucosa: Pico de flauta alcalina color rojo, fondo reacción ácida color amarillo, si existe también producción de H₂S gaseoso, el precipitado puede enmascarar la acidez.

Fermentación de la glucosa y la lactosa: Pico de flauta reacción ácida color amarillo, fondo reacción ácida color amarillo.

No hay fermentación ni de la glucosa ni de la lactosa: Pico de flauta reacción alcalina color rojo, fondo ningún color desarrollado ni cambio de color.

Producción de gas

Aerógeno: Evidente por una de las características siguientes, burbujas en el medio, fragmentación del medio, desplazamiento del medio desde el fondo del tubo dejando una zona libre, desprendimiento ligero del medio de la pared del tubo.

Anaerógeno: Ninguna producción de gas.

Producción de H₂S: Precipitado negro (Sulfuro ferroso).

Diseminación del color negro en todo el fondo.

7.8- Resultados

Reactivación de cepa *E. Coli XL-1 Blue LTC*

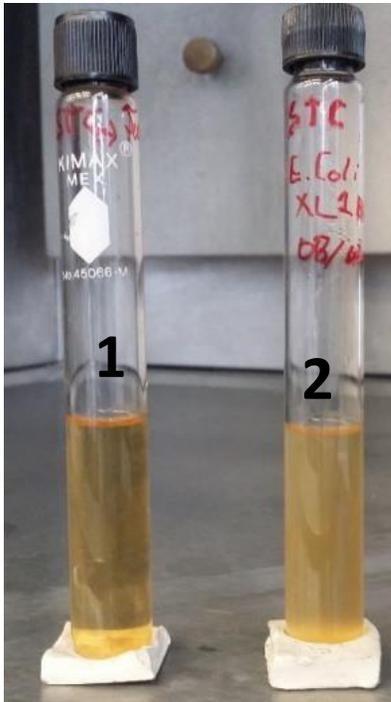


Imagen 7.8. 1

Tubo 1: Caldo Soya tripticaseína incubado 24 h con un inculo de 200 μ L de *E. coli XL1 Blue LTC*.

Tubo 2: Testigo negativo de caldo Soya tripticaseína.

Fecha: 09/03/2017

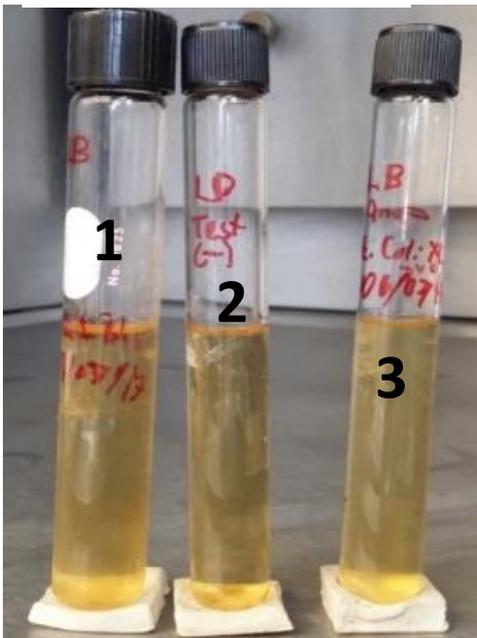


Imagen 7.8. 2

Tubo 1: Caldo LB incubado 24 h con un inculo de 200 μ L de *E. coli XL1 Blue LTC*.

Tubo 2: Testigo negativo de caldo LB.

Tubo 3: Caldo LB con ampicilina incubado 24 h con un inculo de 200 μ L inculo de *E. coli XL1 Blue LTC*.

Fecha: 09/03/2017

Conteo Abril (1° mes)

Control Negativo

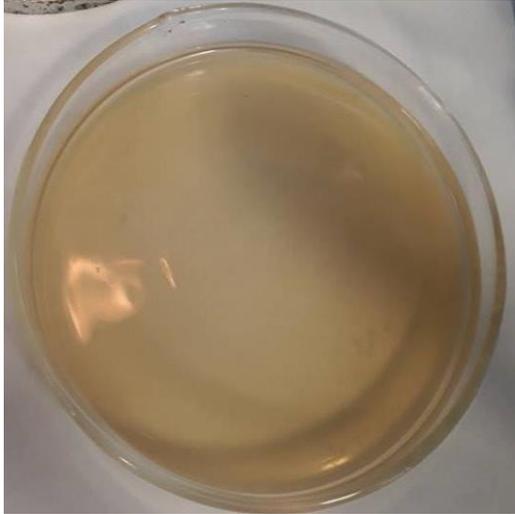


Imagen 7.8. 3

-22°C

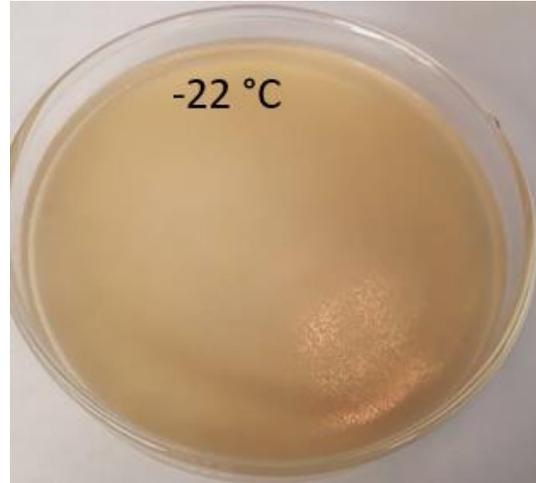


Imagen 7.8. 4
Incontable

-70°C

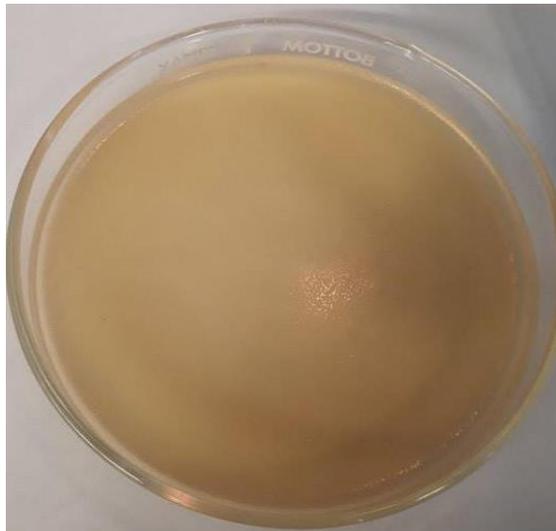


Imagen 7.8. 5

Incontable

-196°C

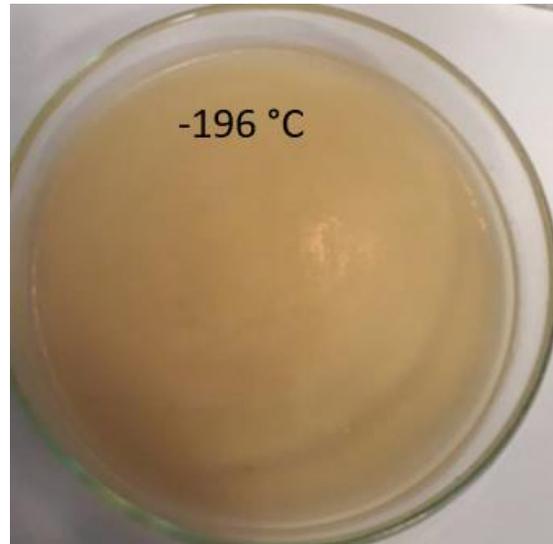


Imagen 7.8. 6

Incontable

Conteo Mayo (2° mes)

Control negativo

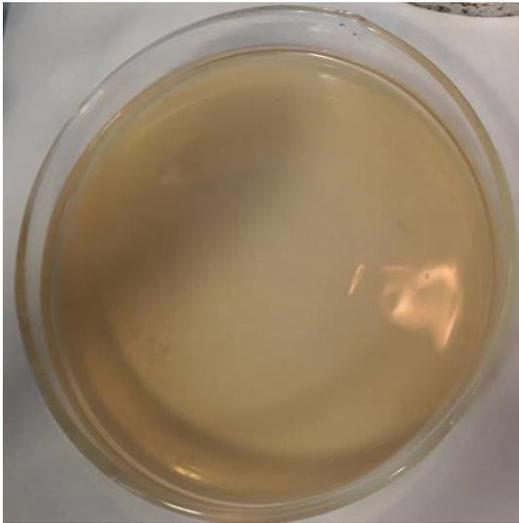


Imagen 7.8. 7

-22°C

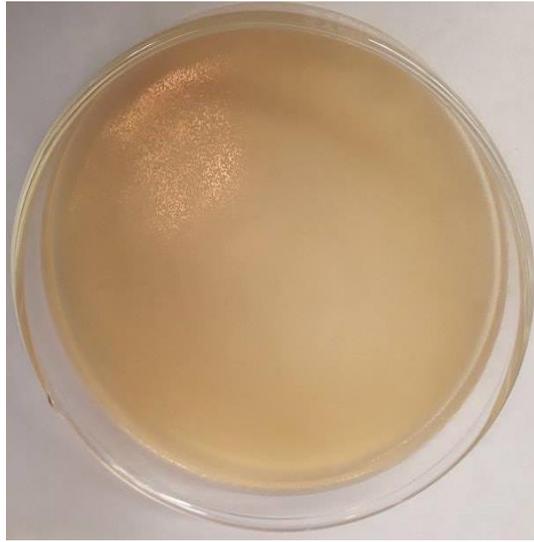


Imagen 7.8. 8

Incontable

-70°C

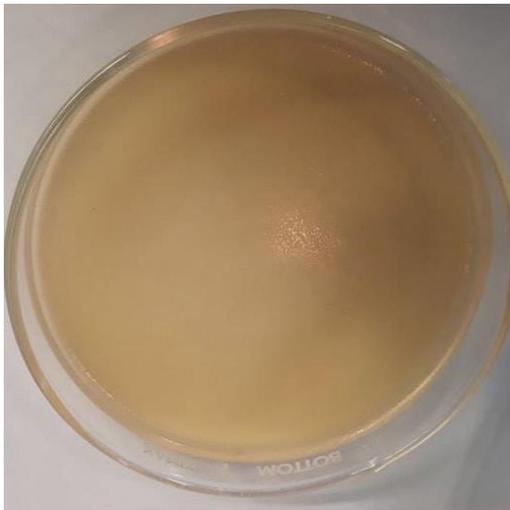


Imagen 7.8. 1

Incontable

-196°C



Imagen 7.8. 2

Incontable

Conteo Junio (3° mes)

Control negativo



Imagen 7.8. 3

-22°C



Imagen 7.8. 4

Incontable

-70°C

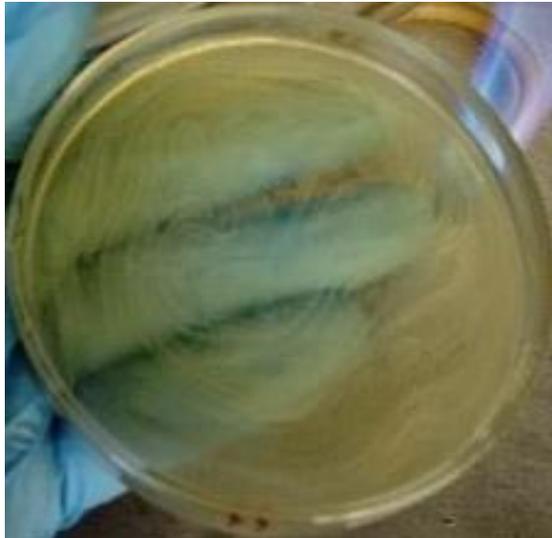


Imagen 7.8. 5

Incontable

-196°C



Imagen 7.8. 6

Incontable

Conteo Julio (4° mes)

Control negativo

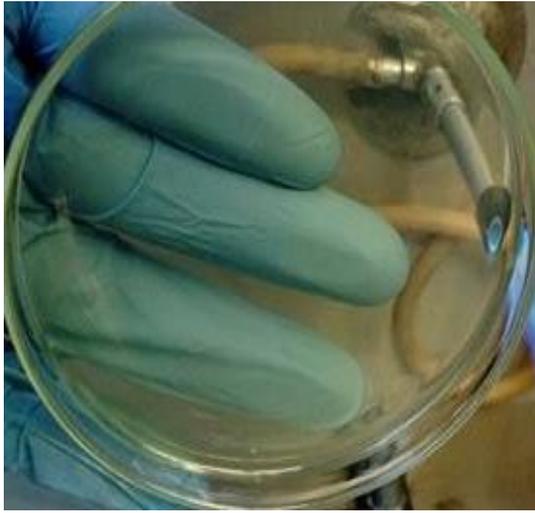


Imagen 7.8. 7

-22°C



Imagen 7.8. 8

Incontable

-70°C



Imagen 7.8. 9

Incontable

-196°C



Imagen 7.8. 10

Incontable

Conteo Agosto (5° mes)

Control negativo



Imagen 7.8. 11

-22°C

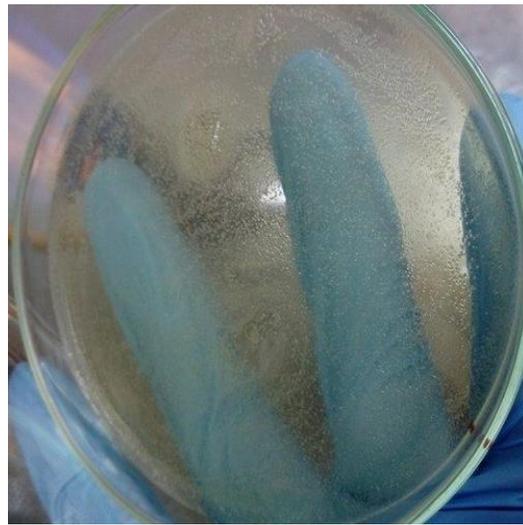


Imagen 7.8. 12

Incontable

-70°C



Imagen 7.8. 13

Incontable

-196°C

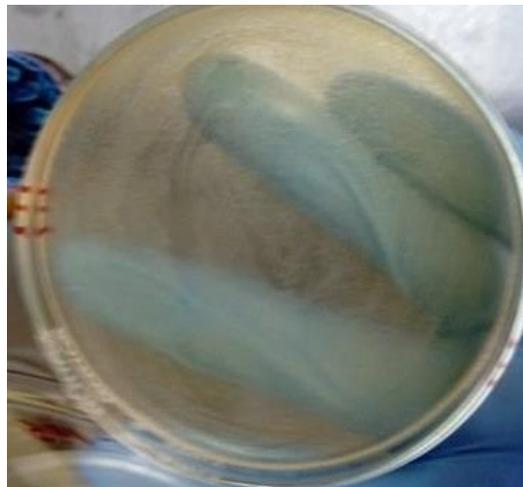


Imagen 7.8. 14

Incontable

Conteo Septiembre (6° mes)

Control negativo



Imagen 7.8. 15

-22°C



Imagen 7.8. 16

Incontable

-70°C



Imagen 7.8. 17

Incontable

-196°C



Imagen 7.8. 18

Incontable

Coloración de Gram

Inicial Marzo 2017

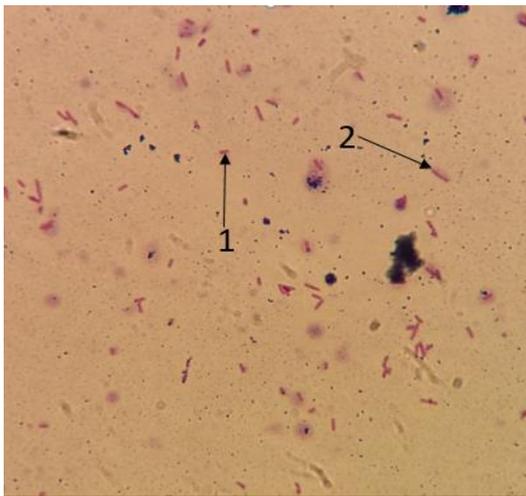


Imagen 7.8. 19

1: Bacilo corto, aparentemente cocobacilo
2: Bacilo largo
Nota: El tamaño de los bacilos es muy variable.
Fecha: 09/03/2017

-22° C Septiembre (6° mes)



Imagen 7.8. 20

1: Bacilo corto, aparentemente cocobacilo
2: Bacilo largo
Nota: El tamaño de los bacilos es muy variable.
Fecha: 26/09/2017

-70° C Septiembre (6° mes)



Imagen 7.8. 21

1: Bacilo corto, aparentemente cocobacilo
2: Bacilo largo
Nota: El tamaño de los bacilos es muy variable.
Fecha: 26/09/2017

-196 °C Septiembre (6° mes)

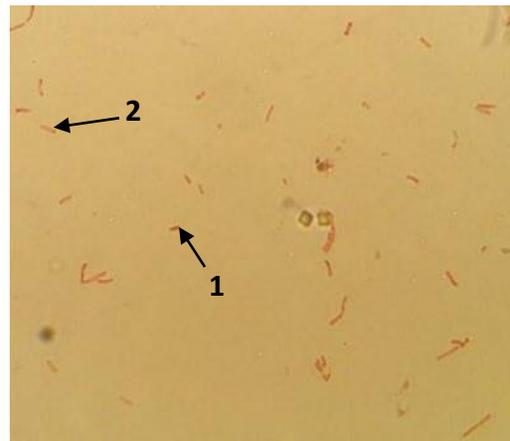


Imagen 7.8. 22

1: Bacilo corto, aparentemente cocobacilo
2: Bacilo largo
Nota: El tamaño de los bacilos es muy variable.
Fecha: 26/09/2017

Agar EMB

Inicial Marzo 2017



Imagen 7.8. 23

Lactosa (+)

***Nota: Fermentador lento de lactosa**

-22 °C Septiembre 2017 (6° mes)



Imagen 7.8. 24

Lactosa (+)

***Nota: Fermentador lento de lactosa**

-70 °C Septiembre 2017 (6° mes)



Imagen 7.8. 25

Lactosa (+)

***Nota: Fermentador lento de lactosa**

-196 °C Septiembre 2017 (6° mes)



Imagen 7.8. 26

Lactosa (+)

***Nota: Fermentador lento de lactosa**

Citrato

Inicial Marzo de 2017



Imagen 7.8. 27

Citrato (-)

1: Control negativo

2: Muestra 1

3: Muestra 2

-22°C Septiembre de 2017 (6° mes)



Imagen 7.8. 28

Citrato (-)

1: Control negativo

2: Muestra 1

3: Muestra 2

-70°C Septiembre de 2017 (6° mes)

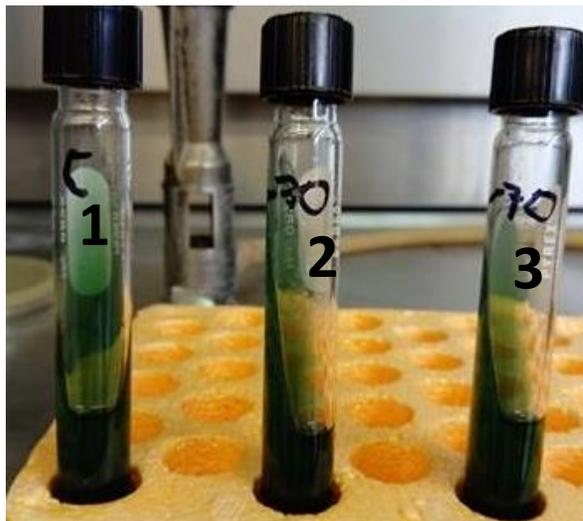


Imagen 7.8. 29

Citrato (-)

1: Control negativo

2: Muestra 1

3: Muestra 2

-196°C Septiembre de 2017 (6° mes)

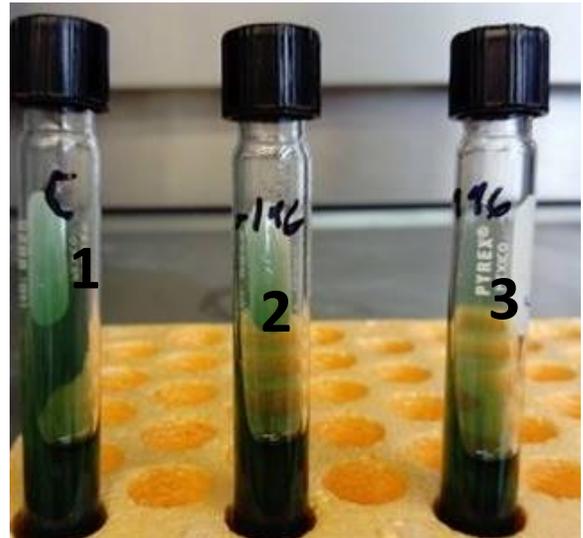


Imagen 7.8. 30

Citrato (-)

1: Control negativo

2: Muestra 1

3: Muestra 2

Sulfuro

Inicial Marzo 2017

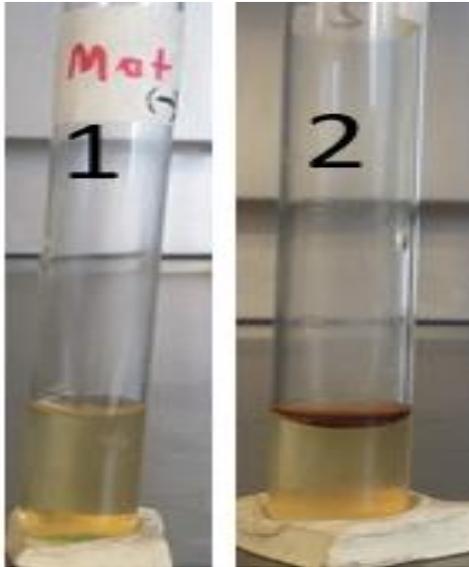


Imagen 7.8. 31

Sulfuro (-)

1: Control negativo

2: Muestra 1

-22°C Septiembre 2017 (6° mes)

Sulfuro (-)

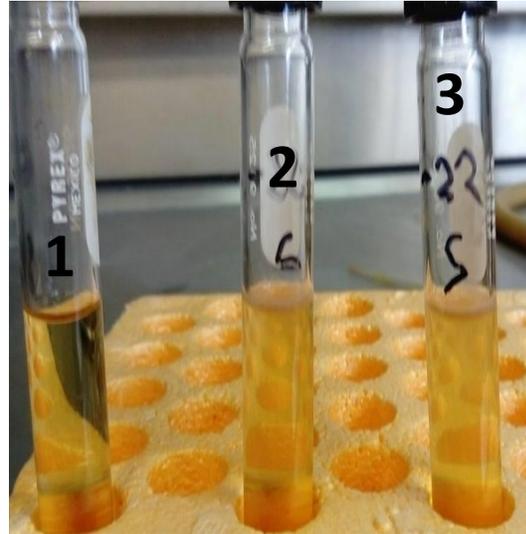


Imagen 7.8. 32

1: Control negativo

2: Muestra 1

3: Muestra 2

-70°C Septiembre 2017 (6° mes)

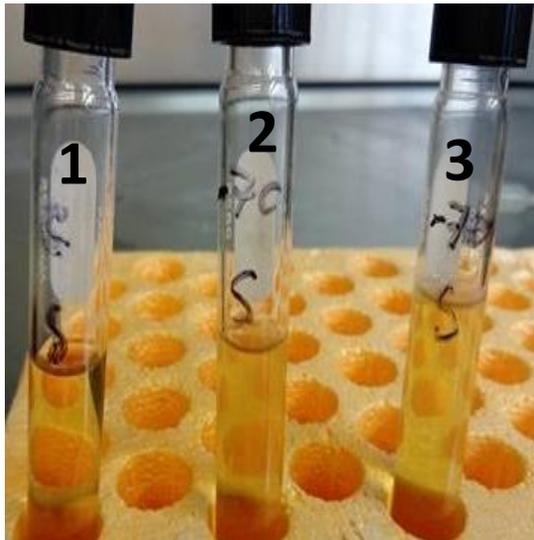


Imagen 7.8. 33

Sulfuro (-)

1: Control negativo

2: Muestra 1

3: Muestra 2

-196°C Septiembre 2017 (6° mes)

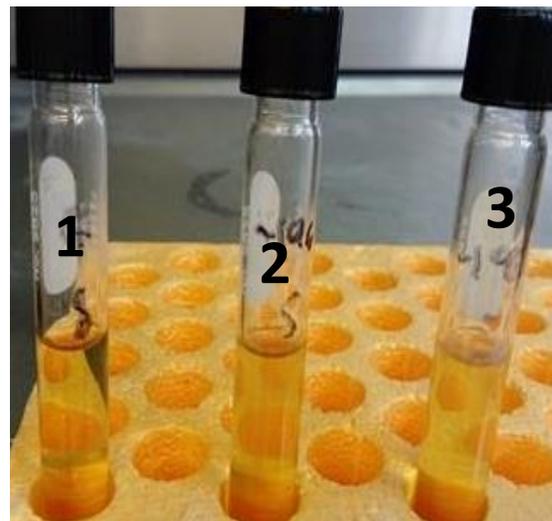


Imagen 7.8. 34

Sulfuro (-)

1: Control negativo

2: Muestra 1

3: Muestra 2

Indol

Inicial Marzo 2017 (6° mes)

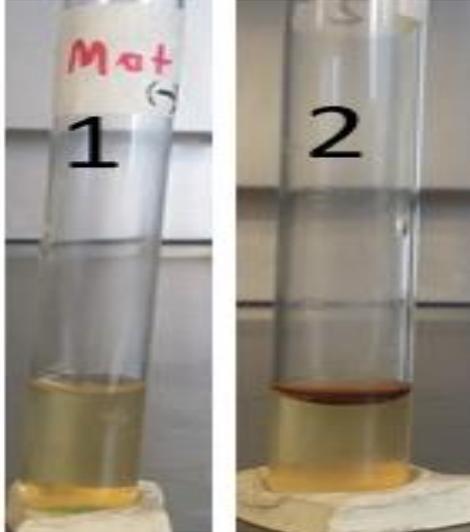


Imagen 7.8. 35

Indol (+)

1: Control negativo
2: Muestra 1

-22°C Septiembre de 2017 (6° mes)



Imagen 7.8. 36

Indol (+)

1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

-70°C Septiembre de 2017 (6° mes)

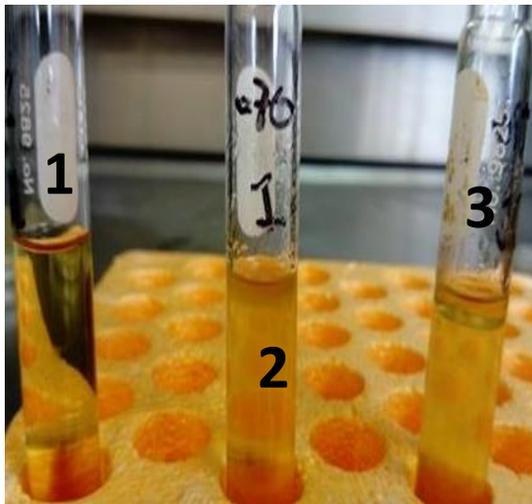


Imagen 7.8. 37

Indol (+)

1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

-196°C Septiembre de 2017 (6° mes)

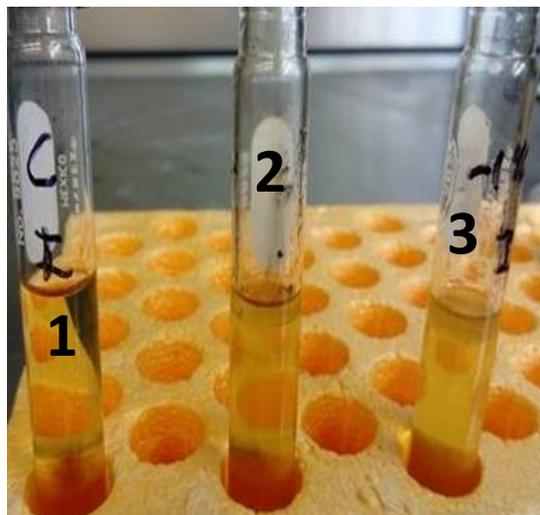


Imagen 7.8. 38

Indol (+)

1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

Motilidad

Inicial Marzo 2017

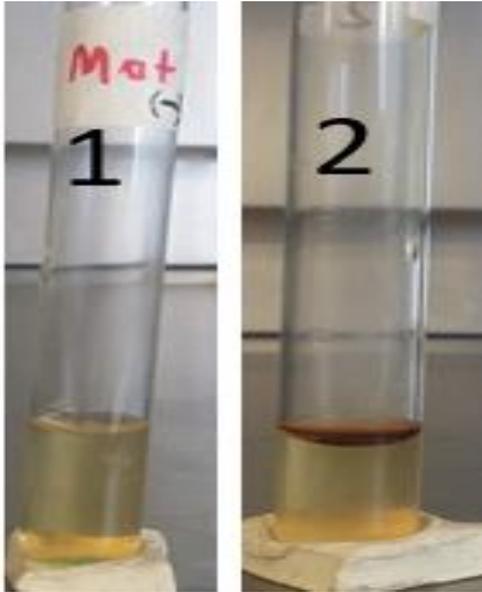


Imagen 7.8. 39

Motilidad (+)

1: Control negativo

2: Muestra 1

-22°C Septiembre de 2017 (6° mes)

Motilidad (+)

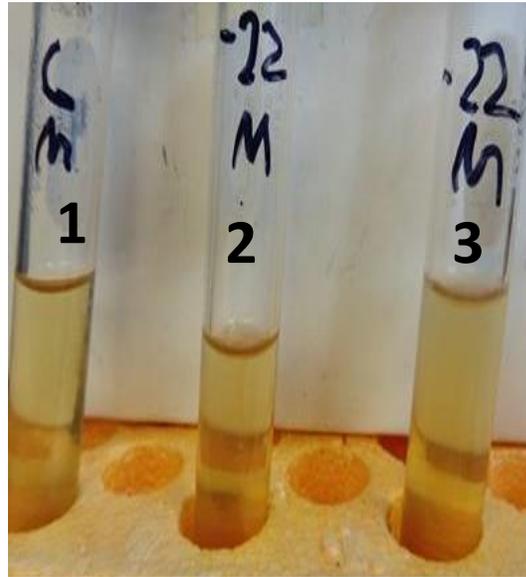


Imagen 7.8. 40

1: Control negativo

2: Muestra 1

3: Muestra 2

-70°C Septiembre de 2017 (6° mes)

Motilidad (+)

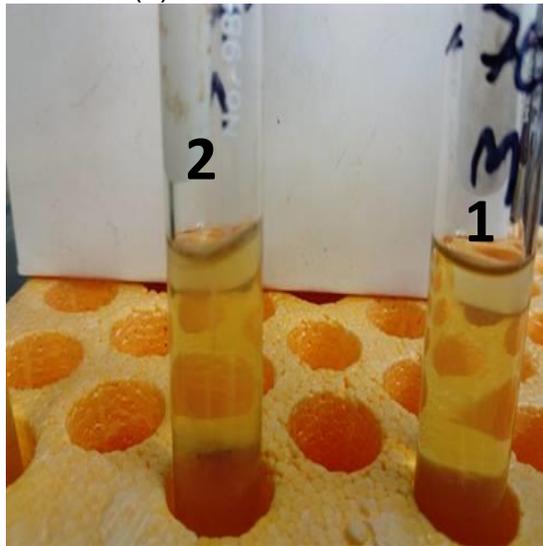


Imagen 7.8. 41

1: Control negativo

2: Muestra 1

-196°C Septiembre de 2017 (6° mes)

Motilidad (+)

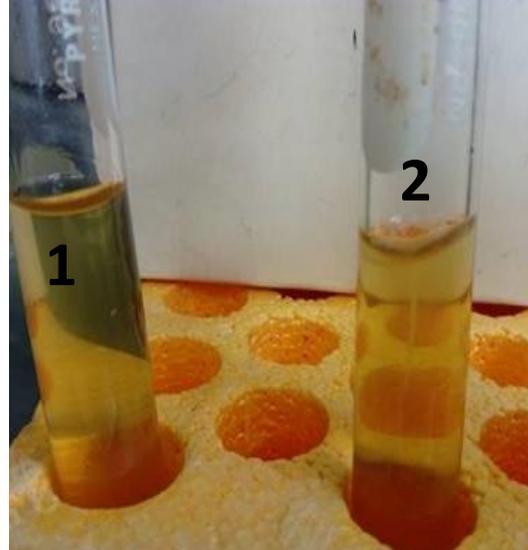


Imagen 7.8. 42

Motilidad (+)

1: Control negativo

2: Muestra 1

KIA

Inicial Marzo 2017

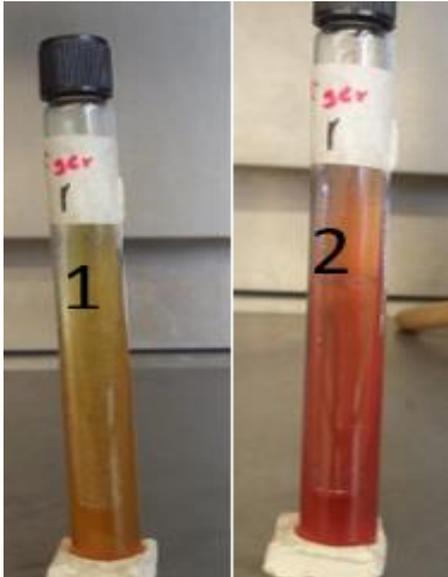


Imagen 7.8. 43

Positivo A/A
2: Control negativo
1: Muestra 1

-22°C Septiembre de 2017 (6° mes)



Imagen 7.8. 44

Positivo A/A
1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra

-70°C Septiembre de 2017 (6° mes)



Imagen 7.8. 45

Positivo A/A
1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

-196°C Septiembre de 2017 (6° mes)

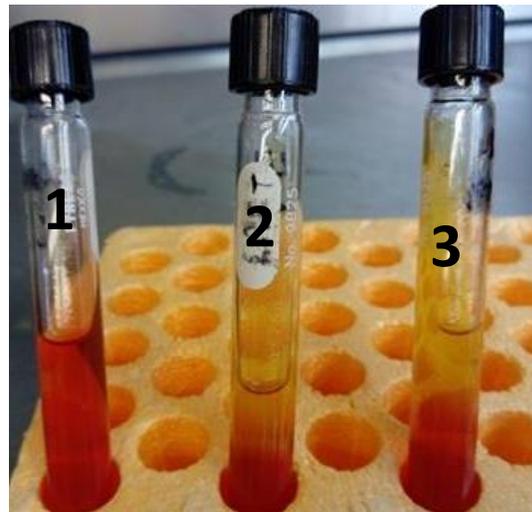


Imagen 7.8. 46

Positivo A/A
1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

TSI

Inicial Marzo 2017

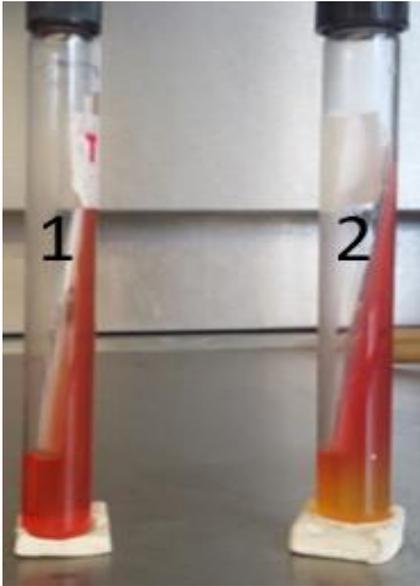


Imagen 7.8. 47

Positivo A/B
1: Control negativo
2: Muestra 1

-22°C Septiembre de 2017 (6° mes)

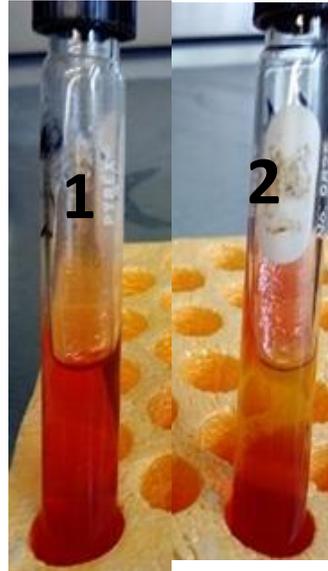


Imagen 7.8. 48

Positivo A/B
1: Control negativo
2: Muestra 1

-70°C Septiembre de 2017 (6° mes)

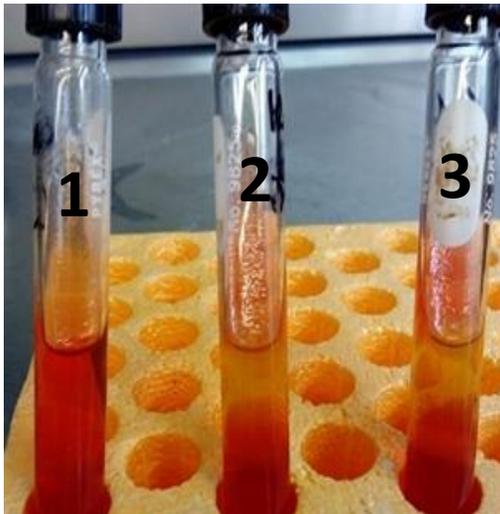


Imagen 7.8. 49

Positivo A/B
1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

-196°C Septiembre de 2017 (6° mes)

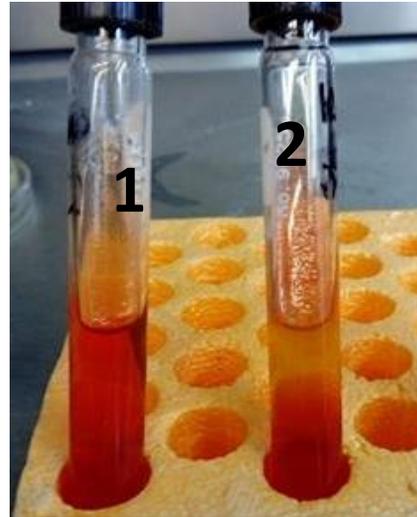


Imagen 7.8. 50

Positivo A/B
1: Control negativo
2: Muestra 1

Rojo de metilo

Inicial Marzo 2017



Imagen 7.8. 51

Rojo de metilo (+)

-22°C Septiembre de 2017 (6° mes)

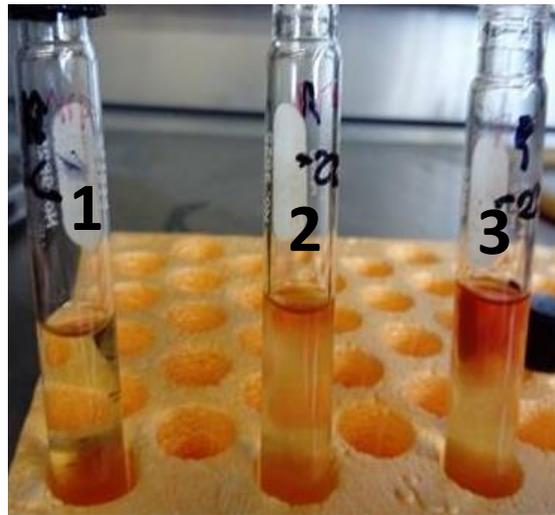


Imagen 7.8. 52

Rojo de metilo (+)

1: Control negativo

2: Muestra 1

3: Muestra 2

-70°C Septiembre de 2017 (6° mes)

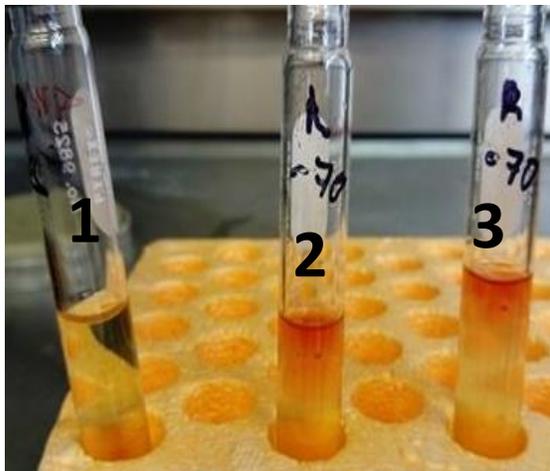


Imagen 7.8. 53

Rojo de metilo (+)

1: Control negativo

2: Muestra 1

3: Muestra 2

-196°C Septiembre de 20 (6° mes)

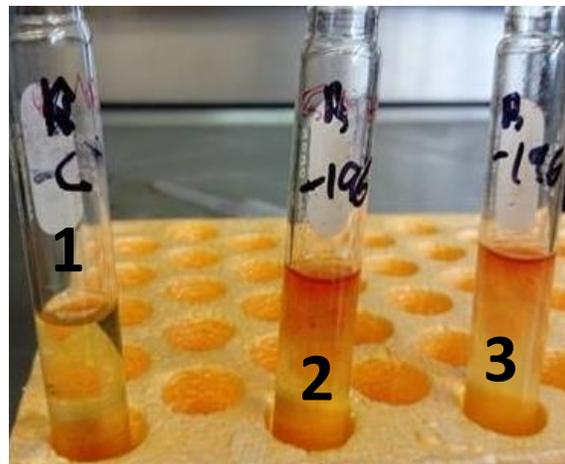


Imagen 7.8. 54

Rojo de metilo (+)

1: Control negativo

2: Muestra 1

3: Muestra 2

Voges-Proskauer

Inicial Marzo 2017

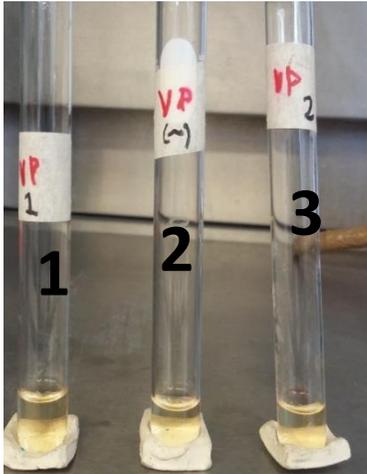


Imagen 7.8. 55

Voges Proskauer(-)

- 1: Control negativo
- 2: Muestra 1
- 3: Muestra 2

-22°C Septiembre de 2017 (6° mes)
Voges Proskauer(-)

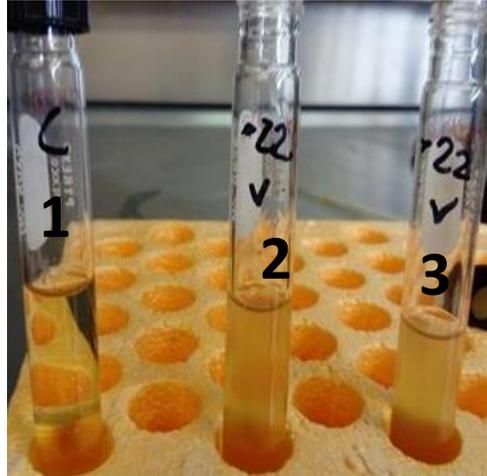


Imagen 7.8. 56

- 1: Control negativo
- 2: Muestra 1
- 3: Muestra 2

-70°C Septiembre de 2017 (6° mes)

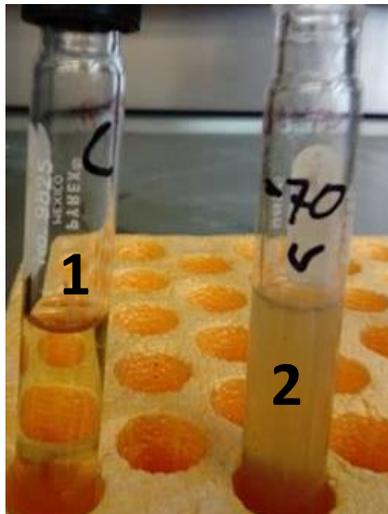


Imagen 7.8. 57

Voges Proskauer(-)

- 1: Control negativo
- 2: Muestra 1

-196°C Septiembre de 2017 (6° mes)

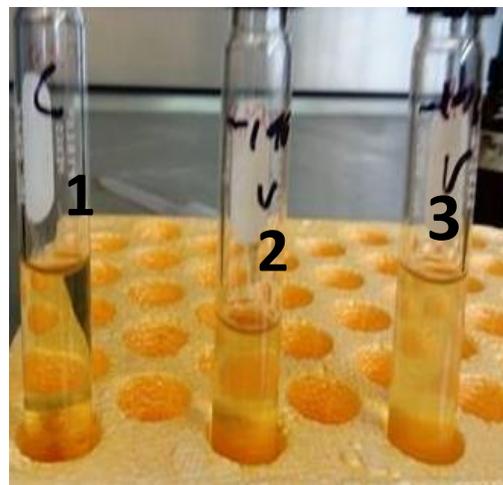


Imagen 7.8. 58

Voges Proskauer(-)

- 1: Control negativo
- 2: Muestra 1
- 3: Muestra 2

Fermentación de glucosa

Inicial Marzo de 2017

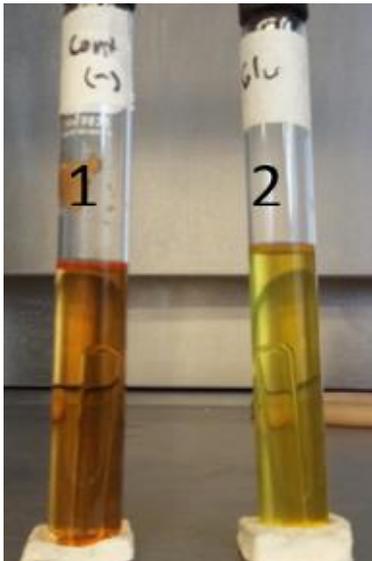


Imagen 7.8. 59

Glucosa (+) Gas (-)
1: Control negativo
2: Muestra 1

-22°C Septiembre de 2017 (6° mes)

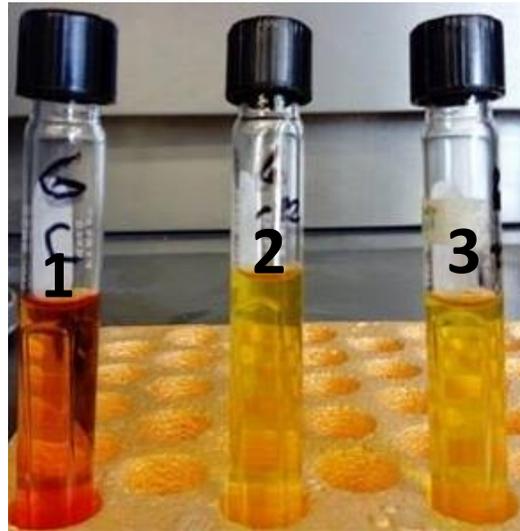


Imagen 7.8. 60

Glucosa (+) Gas (-)
1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

-70°C Septiembre de 2017 (6° mes)

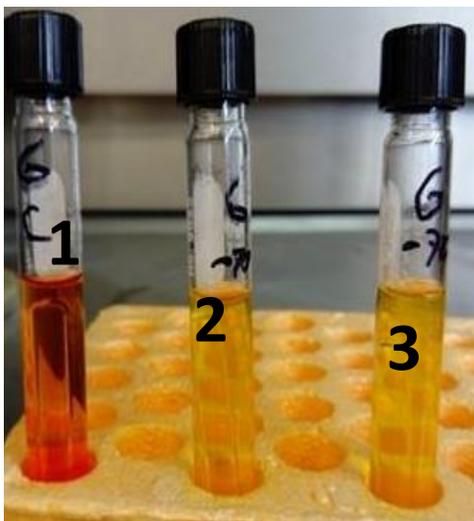


Imagen 7.8. 61

Glucosa (+) Gas (-)
1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

-196°C Septiembre de 2017 (6° mes)

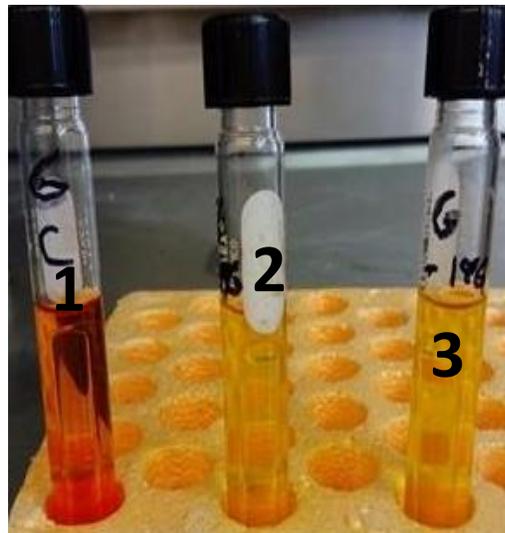


Imagen 7.8. 62

Glucosa (+) Glucosa (+) Gas (-)
1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

Fermentación de Sacarosa

Inicial Marzo de 2017

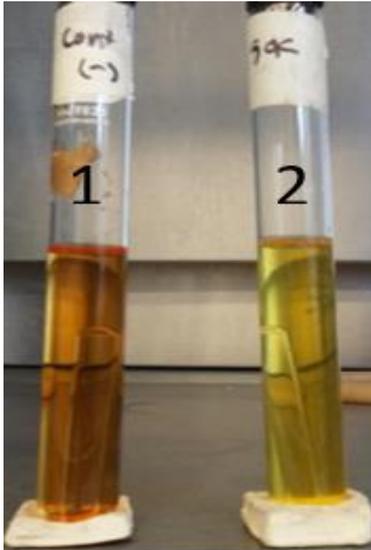


Imagen 7.8. 63

Sacarosa (+) Gas (-)
1: Control negativo
2: Muestra 1

-22°C Septiembre de 2017 (6° mes)



Imagen 7.8. 64

Sacarosa (+) Gas (-)
1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

-70°C Septiembre de 2017

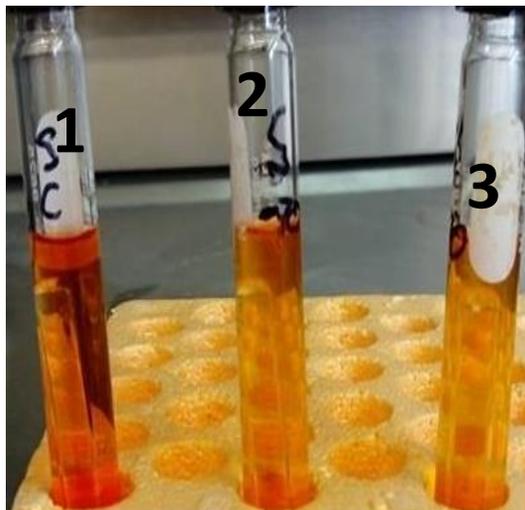


Imagen 7.8. 65

Sacarosa (+) Gas (-)
1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

-196°C Septiembre de 2017

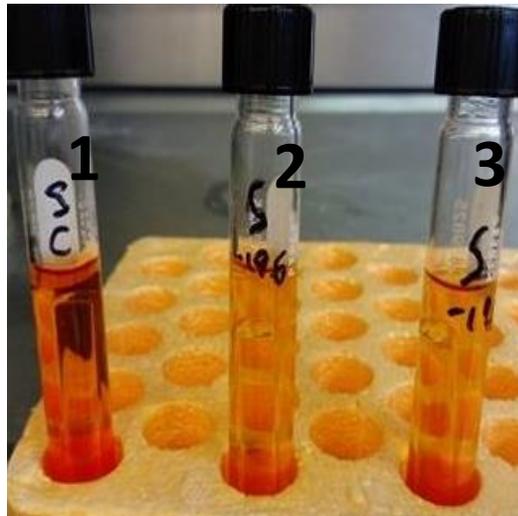


Imagen 7.8. 66

Sacarosa (+) Gas (-)
1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

Fermentación de Lactosa

Inicial Marzo de 2017

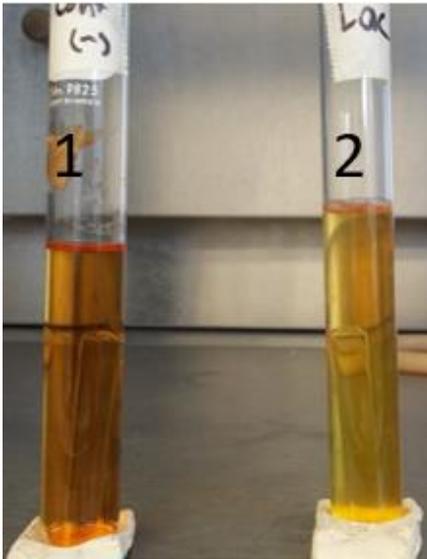


Imagen 7.8. 67

Lactosa (+) Gas (-)

1: Control negativo
2: Muestra 1

-22°C Septiembre de 2017 (6° mes)



Imagen 7.8. 68

Lactosa (+) Gas (-)

1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

-70° Septiembre de 2017 (6° mes)

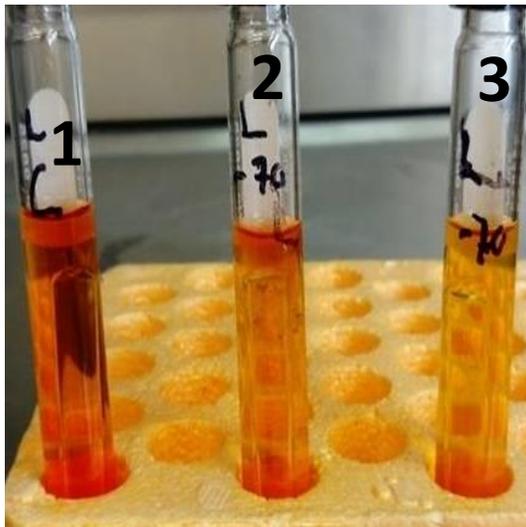


Imagen 7.8. 69

Lactosa (+) Gas (-)

1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

-196° Septiembre de 2017(6° mes)

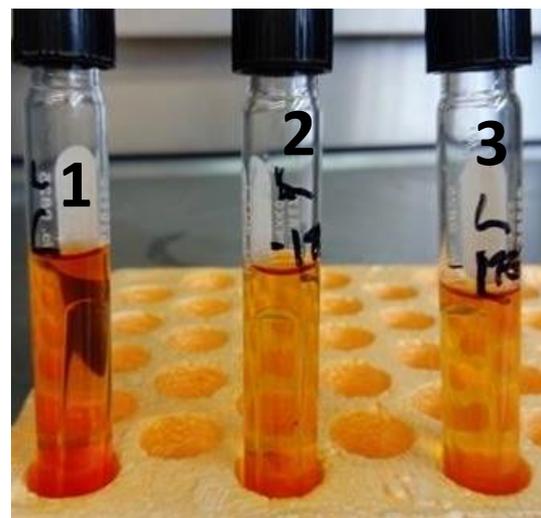


Imagen 7.8. 70

Lactosa (+) Gas (-)

1: Control negativo
2: Muestra 1
3: Muestra 2

8.- Análisis de resultados

En este apartado se analizaron los resultados obtenidos del estudio del ajuste del método de crioconservación para la cepa *E. coli* XL-1 Blue LTC.

Los resultados de las pruebas bioquímicas indican que el microorganismo pertenece a la familia *Enterobacteraeae* en específico el género *Escherichia* de la especie coliforme (*E. coli*), pero esta cepa en particular presenta algunas variaciones en los resultados de identificación ya que es una cepa inactiva y que fue modificada. También, con las pruebas bioquímicas podemos notar que la bacteria conservo estables sus características hasta el final del trabajo.

Viabilidad

En esta prueba se evaluó la viabilidad de la cepa con el método de vaciado en placa por 6 meses, en agar Soya-Trypticaseína a tres diferentes temperaturas -22, -70 y -196 °C. En las imágenes 7.8.3 a 7.8.18 podemos observar que después de incubar las placas inoculadas por un periodo de 24 horas a 37° C, el método de crioconservación fue eficaz para las tres temperaturas, ya que es muy notorio que la carga microbiana aun pasados los 6 meses es alta ya que es imposible realizar un conteo adecuado.

Morfología colonial

Es esta prueba se evaluó la morfología colonial de la cepa al inicio del estudio y al final del mismo poniendo a prueba las tres temperaturas en agar EMB. En las imágenes 7.8.23 a 7.8.26 podemos ver colonias redondas con textura cremosa de 1 a 2 mm de diámetro color rosa, lo que indica que es un microorganismo fermentador

de lactosa, confirmando que la cepa *E. Coli XL1 Blue LTC* es un microorganismo el cual fermenta lento la lactosa ya que en las imágenes 7.8.67 a 7.8.70 podemos observar en la prueba de fermentación de carbohidratos, como después de la incubación el indicador en el medio lo hizo cambiar ligeramente a amarillo, indicando la utilización de lactosa por parte del organismo como única fuente de carbono.

Morfología microscópica

En esta prueba se evaluó la morfología microscópica del microorganismo al inicio del estudio y poniendo a prueba las tres temperaturas al final del mismo con el método de coloración de Gram. En las imágenes 7.8.19 a 7.8.22 se observa claramente que el microorganismo en cuestión es un bacilo de tamaño variable Gram (-).

Pruebas bioquímicas

Indol

En esta prueba se evaluó la capacidad del microorganismo de producir indol a partir de tripotofano en medio SIM al inicio del estudio y poniendo a prueba las tres temperaturas del al final del mismo. En las imágenes 7.8.35 a 7.8.38 se observa claramente la formación de un anillo rojo después de la adición del reactivo de Kovac's.

Motilidad

En esta prueba se evaluó la capacidad o incapacidad de movimiento por parte de un microorganismo cepa al inicio del estudio y al final del mismo poniendo a prueba las tres temperaturas en medio semi-sólido SIM. En las imágenes 7.8.39 a 7.8.42 se observa turbidez en el medio y se extiende más allá de la línea de siembra.

Rojo de metilo

En esta prueba se evaluó la capacidad del microorganismo para producir y mantener estables los productos finales ácidos a partir de la fermentación de la glucosa y para vencer la capacidad buffer de sistema al inicio del estudio y poniendo a prueba las tres temperaturas del al final del mismo. En las imágenes 7.8.51 a 7.8.54, se observa como el medio es lo suficientemente ácido y es capaz de mantener el color rojo brillante.

Voges-Proskauer

En esta prueba se evaluó la capacidad del microorganismo para producir un producto final neutro (acetoina), a partir de la fermentación de glucosa en medio RM/VP al inicio del estudio y poniendo a prueba las tres temperaturas del al final del mismo. En las imágenes 7.8.55 a 7.8.58 se observa claramente el halo amarillo en la superficie del medio después de agregar el reactivo α -Naftol, lo que indica una prueba de Voges-Proskauer negativa.

Citrato de Simons

En esta prueba se evaluó la capacidad del microorganismo de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento con alcalinidad resultante al inicio del estudio y poniendo a prueba las tres temperaturas del al final del mismo. En las imágenes 7.8.27 a 7.8.30, se puede observar claramente que la pruebas es negativa ya que no se ve crecimiento de ningún microorganismo, lo cual nos indica que el micoorganismo no es capaz de usar citrato como fuente de carbono para el metabolismo.

Ácido sulfhídrico.

En esta prueba se evaluó si se ha liberado enzimáticamente ácido sulfhídrico (H_2S) gaseoso a partir de los aminoácidos azufrados para producir una reacción coloreada visible, negra, en presencia de un sistema indicador de H_2S cepa al inicio del estudio y al final del mismo poniendo a prueba las tres temperaturas en medio semi-solido SIM. En las imágenes 7.8.31 a 7.8.34 el medio permanece sin cambio de color a lo largo de la línea de siembra después de agregar reactivo de Kovac's.

Fermentación de carbohidratos

Kliger/TSI

En esta prueba se evaluó la capacidad de un microorganismo para atacar un hidrato de carbono específico incorporado, con producción de gas o sin ella, junto con la determinación de la posible producción de ácido sulfúrico (H_2S) en los al inicio del estudio y al final del mismo poniendo a prueba las tres temperaturas en los medios

KIA/TSI. En las imágenes 7.8.43 a 7.8.50 podemos observar variaciones en las pruebas, lo más consistente es la fermentación de la glucosa y en algunos tubos de la lactosa, sin producción de gas ni H₂S.

Caldo rojo de fenol

Glucosa

En esta prueba se evaluó la capacidad del microorganismo para fermentar (Degradar) glucosa incorporada en caldo rojo de fenol y producir ácido o ácido con gas visible. En las imágenes 7.8.59 a 7.8.62 podemos observar la presencia de un color amarillo en el tubo indica una reacción positiva para la fermentación de glucosa sin producción de gas.

Lactosa

En esta prueba se evaluó la capacidad del microorganismo para fermentar (Degradar) lactosa incorporada en caldo rojo de fenol y producir ácido o ácido con gas visible. En las imágenes 7.8.67 a 7.8.70 podemos observar la presencia de un color amarillo en el tubo indica una reacción positiva para la fermentación de lactosa sin producción de gas.

Sacarosa

En esta prueba se evaluó la capacidad del microorganismo para fermentar (Degradar) sacarosa incorporada en caldo rojo de fenol y producir ácido o ácido con gas visible. En las imágenes 7.8.63 a 7.8.66 podemos observar la presencia

de un color amarillo en el tubo indica una reacción positiva para la fermentación de sacarosa sin producción de gas.

Conclusiones

Viabilidad

Se puede observar que la cepa *E. coli XL-1 Blue LTC* es bioquímicamente estable, lo cual nos indica que el ajuste del micro-método cumplió satisfactoriamente los objetivos establecidos, dando evidencia que las tres temperaturas de congelación son aptas para la conservación del microorganismo.

Pruebas bioquímicas.

Por último, el trabajo experimental del ajuste del micro-método da notar que las tres temperaturas mantuvieron integra las características bioquímicas de la cepa durante el estudio, por lo tanto, podemos decir que el método de criconservación Zaragoza funciona por un periodo de 6 meses a temperaturas de -22°, -170° y -196° C.

Recomendación

Este trabajo al ser el primero en probar temperaturas más bajas de lo habitual da pauta para continuar con un estudio de mayor duración, el cual podría tomar los resultados obtenidos y continuar con un estudio que evalué la estabilidad del microorganismo después de dos años de ser congelado.

Referencias

- 1.- Stuart T. Microbiología, México: McGraw-Hill Interamericana; 2000.
- 2.- MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ra ed. Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana; 2003.
- 3.- Britania. E.M.B agar (con Eosina y Azul de Metileno) [en línea] [Actualización 2010; Consulta 4 de marzo de 2017 14:27]. Disponible en: http://www.britanialab.com/productos/229_hoja_tecnica_es.pdf.
- 4.- World Federation for Culture Collections. Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos [en línea] [Actualización 2012; Consulta 03 de abril de 2017]. Disponible en: http://www.wfcc.info/pdf/Guia_WFCC_espa_ol.pdf.
- 5.- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Curso Teórico-Práctico de Postgrado. Preservación de cultivos en Microbiología Clínica. La Pampa Buenos Aires: Departamento de Química Biológica y de Ciencias Biológicas. UBA; 2002.
- 6.-García MD, Uruburu F. Colección española de cultivos. La conservación de cepas microbianas. Bogotá Colombia: Universitat de València; 2000.
- 7.-Facultad de Bioquímica y ciencias Biológicas. Guía para la conservación de microorganismos. Cátedra microbiológica General. UNL 1999.

8.-Universidad Nacional de Cuyo. Revista de la facultad de ciencias agrarias. Una variante del método de Sordelli para la conservación de cepas microbianas por desecación al vacío. Argentina: Editorial Mendoza digitalizado 12-febrero 2008.

9.-Prescott, Harley y Klein. Microbiología. 7a ed. España: Editorial McGraw-Hill- interamericana, S.A.U; 2009.

10.- Koneman E, Roberts G. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas en color. 6ta ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2012.

11.- Agilent Technologies Company. Competent cells. [en línea] [Actualización 2016; Consulta 05/04/2017 12:31]. Disponible en: <http://www.agilent.com/cs/library/brochures/5989-8281ENUS.pdf>

12.-Morales Y., Duque E., Rodríguez O., De la Torre J., Martínez D., Pérez R., et al. Bacterias preservadas, de una fuente importante de recursos biotecnológicos. BioTecnología. 2010; 14(2): 11-29

13.- Pérez D., Sosa A. Evaluación de la tolerancia a la criopreservación de dos cepas de Escherichia coli K12 de uso frecuente en biotecnología. VaccMonitor. 2010; 19(2): 11-17.

14.- Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology 2003; 46: 205-229.

15.-ICH Harmonised Tripartite Guideline. Derivation and Characterisation of Cell substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products Q5D. [en línea] [Actualización 1997; Consulta 06 de marzo de 2017]. Disponible en: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5D/Step4/Q5D_Guideline.pdf

16.- Sánchez L., Corrales L. Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. Nova-Publicación Científica. 2005; 3: 109-113

17.- Belmonte A., Nogueras M., Contigiani M., Gandini V., Sutich E. Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. Revista Bioquímica y Patología Clínica 2008: 22(2): 15-18.

18.- Thammavongs B., Poncet J., Desmasures M. Panoff J. Resin straw as an alterative system to securely store frozen microorganisms. Journal of Microbiological Methods. 2004; 57; 181-186.

19.- Sivagurunathan P., Kumar G., Lin C. Hydrogen and ethanol fermentation of varius carbon sources by immobilized *Escherichia coli* (XL-1 blue). International Journal of Hydrogen Energy: 2014; 39: 6881-6888.

20.- López E. Implementación de un método de conservación de cepas bacterianas. [Tesis de licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Zaragoza: 2013.

21.- Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11va ed. México: Secretaría de Salud Pública, comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2014.

22.- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas practicas de fabricación de medicamentos. 03 Agosto 2016.

23.- Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-2015, Buenas practicas de fabricación de fármacos. 03 Agosto 2016.

24.- OMS. Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Publica en el Mundo en Desarrollo. [En línea] [Actualización 2003; Consulta 11 de abril de 2017]. Disponible en: http://www.who.int/drugresistance/infosharing/WHO-CDS_CSR_RMD_2003_6_Manual_Laboratorio.pdf

25.- Kumate J. Inmunidad, inmunización, vacunas. 2da ed. Ediciones médicas del hospital infantil de México. México; 1979.

26.- Case C., Funke B., Tortora G. Introducción a la microbiología. 9 na ed. Editorial medica Panamericana. Madrid España; 2007