



Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

“Sistema micro estandarizado para diagnóstico e identificación bacteriana, optimización de recursos y reducción de residuos”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A N

**JESÚS ROMERO SERRANO
JESÚS BENJAMÍN SOLANO SÁNCHEZ**

ASESORA: M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez
COASESORA: M en C. Paola Edith Briseño Lugo

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis y examen profesional**

Sistema micro estandarizado para diagnóstico e identificación bacteriana, optimización de recursos y reducción de residuos.

Que presenta el pasante: **Jesús Romero Serrano**

Con número de cuenta: **309205397** para obtener el título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Agosto de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
VOCAL	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	
SECRETARIO	M. en C. Erik González Ballesteros	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis y examen profesional**

Sistema micro estandarizado para diagnóstico e identificación bacteriana, optimización de recursos y reducción de residuos.

Que presenta el pasante: **Jesús Benjamín Solano Sánchez**

Con número de cuenta: **311122783** para obtener el título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Agosto de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
VOCAL	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	
SECRETARIO	M. en C. Erik González Ballesteros	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

MCVB/cga*

Agradecimientos personales (Jesús Romero)

A mis padres Armando y Norma, por nunca dejarme dar por vencido, por enseñarme que siempre que desee algo me esfuerza, estudie y mejore constantemente hasta lograrlo, por siempre apoyarme darme su amor, comprensión y cariño, sobretodo apoyarme en todo momento en cualquier decisión que tome.

A mi hermano Hector, por ayudarme en cualquier problema, a comprender o ver las cosas desde otro punto de vista, a tener paciencia para explicarme o enseñarme cualquier cosa que me causara curiosidad y sobre todo por ser como un segundo padre para mi.

A mis amigos Aline, Alejandro, Alejandra, Elena, Daniel, Vanessa, Jair y demás amigos que no he nombrado, gracias por hacer de mi etapa universitaria una de las mas bonitas experiencias que he vivido, por compartir desde una plática, estudiar hasta compartir un momento gracioso.

Dedicatoria

A mi abuelo Lorenzo, familia y amigos, que ya no están con nosotros y que nunca dudaron que lo lograría.

Agradecimientos personales (Benjamin Solano)

A mi madre, por jamás rendirse y siempre ser una luchadora incansable que no ha dejado un día de darme su ejemplo, su amor y su incondicional apoyo, porque sin su perseverancia este logro no sería posible.

A Diana, porque desde que llegó a mi vida ha sido mi motivación y mi más grande orgullo, siendo mi inspiración y mi respaldo todos los días de mi vida.

A mis suegros, Lilia y Miguel, por recibirme en su familia, cuidarme, apoyarme y ser unas personas increíbles, porque sin su ayuda este camino no habría sido el mismo.

A mi tío, Alejandro Sánchez, quien me apoyó incondicionalmente en este camino, dándome su apoyo y su compañía sin esperar recompensa alguna.

A mis hermanos, Leonardo, Issac y Zeltzin, por ser mis compañeros de toda la vida y mis mejores amigos, porque espero ser siempre un ejemplo para ustedes, así como lo son ustedes para mí.

A todos mis amigos, Edgar, Rebeca, Melisa, Ixchel, Arely, Diego, Iliana y todas las incontables personas maravillosas que me acompañaron en este viaje, por siempre estar presentes y ser un apoyo fundamental en mi crecimiento personal y profesional.

Dedicatoria

A mi familia y a Diana, por apoyar mi desarrollo profesional de manera incondicional todos los días de mi vida, porque este logro es mío y de todos ustedes.

ÍNDICE

Índice de tablas.....	8
Índice de imágenes.....	9
Abreviaturas.....	10
1.-Introducción.....	11
1.1.- Historia de los medios de cultivo.....	13
1.2.- Clasificación de medios de cultivo.....	17
1.3.- Enterobacteriaceae.....	21
1.4.- Fundamentos de las pruebas bioquímicas.....	23
1.4.1.- Rojo de Metilo Voges Proskauer.....	23
1.4.1.1.-Rojo de Metilo.....	23
1.4.1.2- Voges Proskauer.....	23
1.4.2.- MIO (Motilidad Indol Ornitina).....	24
1.4.3.- Citrato de Simmons.....	24
1.4.4.- LIA (Lisina Hierro Agar).....	25
1.4.5.- Malonatos.....	26
1.4.6.- Caldo Urea de Stuart.....	26
1.4.7.- Fenilalanina.....	27
1.4.8.- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).....	28
1.4.9.- Agar Hierro de Kligler (KIA).....	29
1.4.10.- Nitratos.....	30
2.- Justificación.....	31
3.- Objetivo general.....	31
4.-Objetivos particulares.....	31
5.- Materiales.....	32
6.- Diagramas de proceso.....	33
6.1.- Diagrama No.1 Organización general de trabajo.....	33
6.2.- Diagrama No.2 Proceso para recuperación de cepas.....	34
6.3.- Diagrama No.3 Preparación de caldo tioglicolato.....	34
6.4.- Diagrama No.4 Metodología para la preparación de medios de cultivo agar Sangre y agar Chocolate de tamaño normal	35
6.5.- Diagrama No.5 Metodología para la preparación de medios de cultivo(Mac Conkey, Sales y Manitol, Verde Brillante, Infusion Cerebro Corazon, Eosina Azul de Metileno, Sabouraud Dextrosa Agar,Mueller Hilton) tamaño normal	37
6.6.- Diagrama No.6 Metodología para la preparación de medios de cultivo (Salmonella-Shigella, Sulfito Bismuto, Cetrimida y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato) de tamaño normal	39
6.7.- Diagrama No.7 Metodología para la preparación de medios de cultivo agar Sangre y agar Chocolate de tamaño pequeño	41
6.8.- Diagrama No.8 Metodología para la preparación de medios de	43

cultivo(Mac Conkey, Sales y Manitol, Verde Brillante, Infusion Cerebro Corazon, Eosina Azul de Metileno, Sabouraud Dextrosa Agar,Mueller Hilton) tamaño pequeño	
6.9.- Diagrama No.9 Metodología para la preparación de medios de cultivo (Salmonella-Shigella, Sulfito Bismuto, Cetrimida y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato) de tamaño pequeño	45
6.10.- Diagrama No.10 Metodología para preparación de pruebas bioquímicas (KIA, LIA, SIM, MIO, Fenilalanina y Citrato de Simmons) de tamaño normal	47
6.11.- Diagrama No.11 Metodología para preparación de pruebas bioquímicas (OF, Urea de Stuart) de tamaño normal	49
6.12.- Diagrama No.12 Metodología para preparación de pruebas bioquímicas (Malonatos, Rojo de Metilo, Nitratos y Voges Proskauer) de tamaño normal	51
6.13.- Diagrama No. 13 Metodología para preparación de pruebas bioquímicas (KIA, LIA, SIM, MIO, Fenilalanina y Citrato de Simmons) de tamaño pequeño	53
6.14.- Diagrama No. 14 Metodología para preparación de pruebas bioquímicas (OF, Urea de Stuart) de tamaño pequeño	55
6.15.- Diagrama No. 15 Metodología para preparación de pruebas bioquímicas (Malonatos, Rojo de Metilo, Nitratos y Voges Proskauer) de tamaño pequeño	57
6.16.- Diagrama No.16 Metodología para criopreservación de bacterias	59
6.17.- Diagrama No. 17 Manejo y generación de residuos.....	60
7.- Resultados.....	61
7.1.- Resultados de medios de cultivo.....	61
7.1.1.- <i>Staphylococcus aureus</i>	61
7.1.2.- <i>Staphylococcus epidermidis</i>	62
7.1.3.- <i>Streptococcus</i> grupo A.....	63
7.1.4.- <i>Streptococcus</i> grupo B.....	64
7.1.5.- <i>Alcaligenes faecalis</i>	65
7.1.6.- <i>Burkholdelia cepacea</i>	66
7.1.7.- <i>Citrobacter koseri</i>	67
7.1.8.- <i>Candida</i>	68
7.1.9.- <i>Enterococcus faecalis</i>	69
7.1.10.- <i>Escherichia coli</i>	70
7.1.11.- <i>Morganella morganii</i>	71
7.1.12.- <i>Proteus mirabilis</i>	72
7.1.13.- <i>Proteus vulgaris</i>	73
7.1.14.- <i>Providencia stuartii</i>	74
7.1.15.- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75
7.1.16.- <i>Pseudomonas putida</i>	76
7.1.17.- <i>Salmonella typhi</i>	77
7.1.18.- <i>Serratia marcescens</i>	78
7.2.- Resultados de pruebas bioquímicas primarias y secundarias.....	79
7.3.- Resultados del proceso de criopreservación.....	84
8.- Discusión.....	86
8.1.- Discusión de pruebas bioquímicas.....	86

8.2.- Discusión de criopreservación.....	88
8.3.- Discusión de medios de cultivo.....	89
8.3.1.- Agar Chocolate.....	89
8.3.2.- Agar Sangre.....	90
8.3.3.- Agar Mac Conkey.....	90
8.3.4.- Agar Verde Brillante.....	91
8.3.5.- Agar XLD.....	92
8.3.6.- Agar Salmonella-Shigella.....	93
8.3.7.- Agar Sulfito Bismuto.....	94
8.3.8.- Medio Mueller Hilton.....	95
8.3.9.- Medio Cetrimida.....	95
8.3.10.- Agar Sales y Manitol.....	96
8.3.11.- Medio EMB (Eosina Azul de Metileno).....	96
8.3.12.- Medio SDA (Sabouraud Dextrosa Agar).....	97
9.- Conclusiones.....	98
10.- Referencias.....	100

Índice de tablas

Tabla No.1 Historia de los medios de cultivo	14
Tabla No. 2 Sustancias químicas y compuestos utilizados en medios de cultivo	16
Tabla No. 3 Clasificación de pruebas bioquímicas y medios de cultivo	18
Tabla No. 4 Resultados de la siembra de <u><i>Staphylococcus aureus</i></u> en distintos agares	61
Tabla No. 5 Resultados de la siembra de <u><i>Staphylococcus epidermidis</i></u> en distintos agares	62
Tabla No. 6 Resultados de la siembra de <u><i>Streptococcus grupo A</i></u> en distintos agares	63
Tabla No. 7 Resultados de la siembra de <u><i>Streptococcus grupo B</i></u> en distintos agares	64
Tabla No. 8 Resultados de la siembra de <u><i>Alcaligenes faecalis</i></u> en distintos agares	65
Tabla No. 9 Resultados de la siembra de <u><i>Burkordelia cepacea</i></u> en distintos agares	66
Tabla No. 10 Resultados de la siembra de <u><i>Citrobacter koseri</i></u> en distintos agares	67
Tabla No. 11 Resultados de la siembra de distintas especies de <u><i>Candida</i></u> en agar SDA (Sabouraud Dextrosa Agar)	68
Tabla No. 12 Resultados de la siembra de <u><i>Enterococcus faecalis</i></u> en distintos agares	69
Tabla No. 13 Resultados de la siembra de <u><i>Escherichia coli</i></u> en distintos agares	70
Tabla No. 14 Resultados de la siembra de <u><i>Morganella morganii</i></u> en distintos agares	71
Tabla No. 15 Resultados de la siembra de <u><i>Proteus mirabilis</i></u> en distintos agares	72
Tabla No. 16 Resultados de la siembra de <u><i>Proteus vulgaris</i></u> en distintos agares	73
Tabla No. 17 Resultados de la siembra de <u><i>Providencia stuartii</i></u> en distintos agares	74
Tabla No. 18 Resultados de la siembra de <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> en distintos agares	75
Tabla No. 19 Resultados de la siembra de <u><i>Pseudomonas putida</i></u> en distintos agares	76
Tabla No. 20 Resultados de la siembra de <u><i>Salmonella typhi</i></u> en distintos agares	77
Tabla No. 21 Resultados de la siembra de <u><i>Serratia marcescens</i></u> en distintos agares	78
Tabla No. 22 Resultados de pruebas bioquímicas para cierto grupo de bacterias	79
Tabla No. 23 Resultados de pruebas bioquímicas secundarias para ciertas bacterias	83

Indice de Imagenes

Imagen No. 1 Estructura de género <i>Enterobacteriaceae</i>	22
Imagen No. 2 Pruebas bioquímicas IMVIC.....	25
Imagen No. 3 Prueba bioquímica LIA.....	25
Imagen No. 4 Prueba bioquímica Malonatos.....	26
Imagen No. 5 Prueba bioquímica Urea.....	27
Imagen No. 6 Prueba bioquímica: Fenilalanina desaminasa.....	28
Imagen No. 7 Prueba bioquímica TSI (Triple Sugar Iron Agar).....	28
Imagen No. 8 Prueba bioquímica KIA (Kligler Iron Agar).....	30
Imagen No. 9 Malonatos (+/-).....	79
Imagen No. 10 LIA.....	80
Imagen No. 11 Resultado (+/-) Prueba MIO.....	80
Imagen No. 12 Resultado (+/-) Prueba OF.....	81
Imagen No. 13 Resultado (+/-) Prueba SIM.....	81
Imagen No. 14 Resultado (+/-) Prueba Urea.....	82
Imagen No. 15 Resultado (+/-) Prueba de Citrato de Simmons.....	82
Imagen No. 16 Cepas Criopreservadas.....	84
Imagen No. 17 Establecimiento de número único de identificación.....	84
Imagen No. 18 Comparación de medios de cultivo de tamaño normal con un volumen aproximado $\pm 20\text{mL}$. y tamaño pequeño con un volumen aproximado de $\pm 5\text{mL}$	85
Imagen No. 19 Comparación de pruebas bioquímicas tamaño normal con un volumen aproximado $\pm 2\text{mL}$. y tamaño pequeño con un volumen aproximado de $\pm 0.5\text{mL}$	85

Abreviaturas

ARN	Ácido ribonucleico	NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
BHI	Infusion Cerebro Corazon	NH₂	Grupo Amino
CO₂	Dióxido de Carbono	NH₃	Amoniac Libre
DMSO	Dimetilsulfóxido	O₂	Oxígeno Molecular
EMB	Eosina Azul de Metileno	OF	Prueba de Oxidación Fermentación
FeCl₃	Cloruro Férrico	O/F	Prueba de Oxidación Fermentación
FeS	Sulfuro de Hierro	pH	Potencial de Hidrógeno
H₂S	Sulfuro de Hidrógeno	RM	Rojo de Metilo
IMVIC	Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer, Citrato	SB	Agar Sulfito Bismuto
K₂HPO₄	Fosfato Dibásico de Potasio	SDA	Sabouraud Dextrosa Agar
KH₂PO₄	Fosfato Monobásico de Potasio	SIM	Motilidad Indol Sulfuro
KIA	Agar Hierro de Kligler	SM	Agar Sales y Manitol
KOH	Hidróxido de Potasio	SS	Agar Salmonella Shigella
LD	Lisina Descarboxilasa	TSI	Agar Triple Azúcar Hierro
MC	Mac Conkey	VD	Agar Verde Brillante
MH	Mueller Hilton	VP	Voges Proskauer
MIO	Motilidad Indol Ornitina	XLD	Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

1.-Introducción.

Antes de que se conociera la existencia de los microbios, todos los organismos se agrupaban en el reino animal o en el reino vegetal. Cuando se descubrieron los organismos microscópicos con características de animales o vegetales a fines del siglo XVII fue necesario desarrollar un nuevo sistema de clasificación. (Tortora, 2007)

Con el avance de la ciencia y la tecnología en el siglo XX, y gracias al desarrollo de la biotecnología y técnicas de secuenciación, las técnicas clásicas de clasificación e identificación de organismos tuvieron un gran avance. En la segunda mitad del siglo XX, el microbiólogo estadounidense Carl Richard Woese, aplicando métodos que le permitieron la comparación de segmentos de ácidos nucleicos y eligiendo en particular un gen que codifica el ARN, el cual integra la subunidad menor del ribosoma, propuso una nueva clasificación denominada el sistema de los tres dominios: Eukarya, Bacteria y Archaea. (Spivak, 2006)

Las bacterias son microorganismos unicelulares, con un tamaño medido en micrómetros (entre 0.5 a 5). Son procariontes, lo que significa que no poseen un núcleo ni presentan orgánulos internos. Algunas de ellas poseen sistemas de desplazamiento que les permiten movilidad y diseminación. Por lo general, también cuentan con una pared celular, en la cual el peptidoglicano se considera como componente característico y propio de estas. (MacFaddin, 2003)

La toma de muestras es un conjunto de procedimientos destinados para obtener una parte representativa ya sea cualitativa o cuantitativamente. Para realizar las siembras se requiere de los medios de cultivo, los cuales son una mezcla de sustancias nutritivas, donde las bacterias obtienen su fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, sodio, magnesio, y otros elementos para fomentar su crecimiento y facilitar algunas reacciones bioquímicas que pueden ser demostradas directa o indirectamente para ayudar a su identificación. (Farias, 2015) .

Los constituyentes habituales de un medio de cultivo con: Agar; que se utiliza como agente gelificante para dar solidez a los medios de cultivo. Extractos; que son concentrados en polvo, deshidratados, obtenidos de órganos o tejidos animales o vegetales para producir medio adecuado. Peptonas; se obtienen por digestión enzimática o química de proteínas animales o vegetales, siendo ricas en péptidos y aminoácidos.

Además utilizan sistemas amortiguadores, que generalmente son fosfatos bi sódicos o bi potásicos que se utilizan para mantener el pH del medio en un determinado valor. (Farias, 2015)

Los medios de cultivo se clasifican según su estado físico y su función en: medios líquidos, medios sólidos; preparados a partir de medios líquidos a los cuales se les agrega un agente gelificante como la gelatina o el agar. Por último, los medios semisólidos, que se preparan a partir de los medios líquidos agregando agentes gelificantes en una proporción menor que para preparar un medio sólido. Se utilizan principalmente para la investigación de la movilidad de las bacterias. (Prats, 2006)

En cuanto a su función, los medios de cultivo se pueden clasificar como: Medios de apoyo o medios nutritivos básicos; que favorecen el desarrollo de la mayoría de los microorganismos sin requerimientos especiales y sin brindar ventaja alguna en el crecimiento de un microorganismo en particular. Por otro lado, los medios enriquecidos son aquellos básicos que han sido complementados con lípidos corporales, vitaminas específicas, aminoácidos, proteínas u otros nutrientes claramente definidos. Los medios de enriquecimiento son aquellos que además de las sustancias nutritivas normales incorporan una serie de factores indispensables o nutrientes específicos, además de sustancias inhibitorias con la que se crea un ambiente especialmente favorable para el crecimiento de microorganismos patógenos exigentes que pueden estar presentes solos o con otras bacterias en una muestra. (Riedel, 2020))

Dentro de la clasificación podemos encontrar también medios selectivos, que favorecen el desarrollo de ciertas bacterias de interés dentro de una población polimicrobiana, inhibiendo el desarrollo de otras con ayuda de agentes inhibidores como colorantes, sales biliares, alcoholes, ácidos y antibióticos. Además se encuentran los medios diferenciales, que se utilizan para poner en evidencia ciertas características bioquímicas o metabólicas que permiten diferenciar entre varias especies o géneros que crecen en la misma placa de agar. Por último, los medios de identificación se destinan para realizar las pruebas bioquímicas en donde se resalta alguna cualidad bioquímica que sirve para reconocer la identidad de un microorganismo . Estos medios han de poseer los elementos necesarios para asegurar el crecimiento de las bacterias, un sustrato específico que va a ser metabolizado y el indicador que muestre el resultado. (Romero, 2018)

Actualmente la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales, basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más asequibles.

Los esquemas de identificación fenotípica se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. Las pruebas bioquímicas se emplean para identificar de forma clara y precisa, la presencia o ausencia de una enzima, de un grupo de enzimas, o de una vía metabólica completa en uno o más microorganismos. (Forbes, 2009)

En el proceso de identificación bacteriana tradicional se establecen tres niveles de procesamiento:

a) Todas las características fenotípicas conocidas son importantes y hay que tenerlas en cuenta cuando se inicia el proceso de identificación, pero en principio se seleccionan aquellas que se consideran pruebas primarias, que son rápidas y sencillas de realizar.

b) El segundo nivel de identificación debe especificar el género al que pertenece el microorganismo. Tanto en este nivel como en el anterior, la hipótesis sobre la probable identidad de un microorganismo se apoya en las características del cultivo (por ejemplo atmósfera) y en pruebas primarias.

c) Por último, la conclusión debe hacerse con la identificación a nivel de especie. El empleo de ciertas pruebas bioquímicas permite identificar con un alto grado de precisión la mayoría de las bacterias clínicamente significativas. (Bizzini, 2010)

Dadas las normativas existentes en México para el manejo de residuos biológicos infecciosos tal y como lo dicta la Norma Oficial Mexicana 087-ECOL-SSA1-2002 la cual dicta que los diferentes residuos generados como es el caso de los cultivos y cepas de agentes infecciosos los cuales se desechan en bolsas de polietileno de color rojo con el símbolo de peligro biológico infeccioso llenándose al 80% de su capacidad cerrándose para ser transportadas en un sitio de almacenamiento temporal y no podrán ser abiertas o vaciadas, guardándose en un almacén temporal de rpbi para su posterior eliminación por incineración. (Cassio Luiselli Fernández, Ernesto Enriquez Rubio, 2003)

1.1.-Historia de los medios de cultivo.

Pasteur en 1860 publicó sobre el uso de un medio de cultivo líquido para la levadura. Joseph Lister, un cirujano inglés, publicó en 1878 un trabajo sobre la fermentación láctea con lo cual comprobó que era una bacteria la causa de este fenómeno y consiguió cultivos puros por medio de un proceso de dilución. Asumió que de las bacterias que viera al microscopio, la que predominaba era la responsable.(Ingraham, 2004)

El uso de medios sólidos comenzó en Alemania con Jens Frederik Schroeter quien en 1872 usó papá, pan, pasta de almidón, y clara de huevo para cultivar bacterias. El microbiólogo Brefeld en 1881 utilizó gelatina para sus hongos. Robert Koch, un médico alemán, comenzó trabajando con rodajas de papa estéril en vasijas de vidrio estériles, las cuales inoculaba con bacterias. Luego encontró ventajoso solidificar sus mejores medios líquidos con gelatina, vertiendo su preparación sobre láminas de vidrio protegidas de la contaminación por medio de una campana. Usando una aguja de platino inició la práctica de hacer estriados sobre el medio, para luego escoger los distintos tipos de colonias que se desarrollaban y establecer cultivos puros en tubos con medio solidificado en posición inclinada. Modificó luego este procedimiento incorporando las bacterias al medio antes de verter. (González. 2018)

La gelatina fue reemplazada en los laboratorios de Koch por agar, un agente solidificante que fue sugerido por la esposa de uno de sus colegas que había vivido en el oriente donde se le usa en repostería. Un paso gigantesco en la técnica de cultivos fue la innovación de E. J Petri quien trabajó con Koch diseñando una placa de cultivo, cuyo uso describió en 1887, y que sigue usándose sin modificación en el diseño hasta la fecha. (Garcia, 2017)

Koch realizó sus investigaciones utilizando en un primer momento rodajas de patata como soporte nutritivo sólido, pero no tardó en recurrir al caldo de carne líquido, diseñado por Loeffler, al que, en 1881, añadió gelatina, logrando un medio sólido transparente ideal para la observación de la morfología macroscópica de las colonias microbianas. (Picazo de la Garza, 2016)

Beijerinck y Winogradsky, que desde 1888 realizaron sus investigaciones sobre las bacterias quimioautótrofas (utilización de nitrógeno y azufre en su mayoría) tuvieron gran importancia en el desarrollo de los medios selectivos y de enriquecimiento. Diseñaron este tipo de medios de tal forma que su especial composición química favorecía el crecimiento de ciertos tipos de

microorganismos que, en función de sus procesos metabólicos, eran los únicos capaces de utilizar para su desarrollo ciertos nutrientes del medio (Molina, 2019)

En 1892 Würtz impulsó el uso de los medios diferenciales, incorporando indicadores de pH a la composición de ciertos medios de cultivo, con lo cual se podía observar la producción de ácidos en la fermentación en ciertos microorganismos. (González. 2018)

Tabla No.1 Historia de los medios de cultivo

Año	Acontecimiento
1860	Luis Pasteur, publica el uso de medio de cultivo líquido para hongos levaduriformes
1872	Jens Frederik-Schroeter en Alemania comienza el uso de medios sólidos para el uso de la papa, pan, pasta de almidón, y clara de huevo para cultivar bacterias.
1878	Joseph Lister cirujano inglés publica su trabajo sobre la fermentación láctea, con lo cual comprobó que una bacteria es la causante de este fenómeno consiguiendo así cultivos puros por medio de un proceso de dilución, asumiendo así que las bacterias que se observan al microscopio, la predominante es la responsable de dicho fenómeno.
1881	Brefeld utilizó la gelatina para el cultivo de hongos.
1881	Robert Koch, un médico alemán comenzó a trabajar con rodajas de papa estéril en vasijas de vidrio estéril, las cuales inoculación con bacterias Luego encontró ventajoso solidificar sus mejores medios líquidos con gelatina, vertiendo su preparación sobre láminas de vidrio protegidas de la contaminación por medio de una campana. Usando una aguja de platino inició la práctica de hacer estriados sobre el medio, para luego escoger los distintos tipos de colonias que se desarrollaban y establecer cultivos puros en tubos con medio solidificado en posición inclinada. Modificó luego este procedimiento incorporando las bacterias al medio antes de verter. La gelatina fue reemplazada en los laboratorios de Koch por agar, un agente solidificante que fue sugerido por la esposa de uno de sus colegas que había vivido en el oriente donde se le usa en repostería.
1887	E. J. Petri realiza un paso gigantesco en la técnica de cultivos diseñando una placa de cultivo en conjunto con Roberto Koch, este diseño se utiliza sin modificación hasta la fecha.
1888	Beijerinck y Winogradsky realizaron sus investigaciones sobre las bacterias quimioautótrofas (utilización de nitrógeno y azufre en su mayoría) tuvieron gran importancia en el desarrollo de los medios selectivos y de enriquecimiento. Diseñaron este tipo de medios de tal forma que su especial composición química favorecía el crecimiento de ciertos tipos de microorganismos que, en función de sus procesos metabólicos, eran los únicos capaces de utilizar para su desarrollo ciertos nutrientes del medio.
1892	Würtz impulsó el uso de los medios diferenciales incorporando indicadores de pH a la composición de ciertos medios de cultivo, con la cual se lograba

	observar la producción de ácidos en la fermentación en ciertos microorganismos.
--	---

El medio de cultivo constituye el aporte de nutrientes indispensables para el crecimiento de los microorganismos. La composición precisa dependerá de la especie que se quiera cultivar, porque las necesidades nutricionales varían considerablemente.

Hay microorganismos muy poco exigentes que crecen bien en medios de laboratorio normales y microorganismos muy exigentes que necesitan determinadas sustancias como vitaminas, suero o sangre para crecer. (Braun, 2017)

Por lo general se puede diseñar un medio adecuado el cual reproduce cuidadosamente las condiciones que el microorganismo encuentra en su ambiente natural. Es fácil reproducir el pH, la temperatura y la aireación: el mayor problema lo representan los nutrientes.

La siembra en placas de una muestra del material, bajo una serie de condiciones, permite producir colonias a un grupo seleccionado de microorganismo pero hace pasar inadvertidos.

Por tanto, el cultivo de enriquecimiento es un procedimiento mediante el cual se prepara el medio de cultivo para reproducir el ambiente natural. (Koneman, 2017)

Tabla No. 2 Sustancias químicas y compuestos utilizados en medios

Sustancia química o compuesto	Descripción
Hidrolizados proteicos	Los ácidos o las enzimas escinden las proteínas en aminoácidos y péptidos que las bacterias pueden utilizar para proporcionar el carbono y nitrógeno necesarios para el metabolismo bacteriano. (por ejemplo peptonas, infusión de carne, triptonas y caseína).
Hidratos de carbono	Se incluyen diversos disacáridos en los medio selectivos por 2 razones: <ol style="list-style-type: none">1. Proporcionar una fuente de carbono y energía2. Para servir como sustratos en las reacciones bioquímicas para la identificación de microorganismos desconocidos. (Por ejemplo: lactosa, sacarosa y maltosa, hexosas(dextrosa) y pentosas (xilosa)).
Amortiguadores	Se utilizan principalmente fosfatos monodisodicos, disodicos y potásicos balanceados. Los amortiguadores brindan: <ol style="list-style-type: none">1. pH estable para el crecimiento óptimo de los microorganismos.2. pH estándar de referencia para los medios en los que se emplean reacciones ácidas o alcalinas para identificar microorganismos
Enriquecimientos	Los complementos para el crecimiento se añaden a los medios para aislar microorganismos con requerimientos nutricionales especiales. Los enriquecimientos se utilizan con menor frecuencia para el aislamiento de tipos específicos de un género bacteriano. (por ejemplo: sangre, suero, complementos vitamínicos y extractos de levaduras).

Tabla No. 2 Sustancias químicas y compuestos utilizados en medios (continuación)

Sustancia química o compuesto	Descripción
Inhibidores	<p>Varios compuestos pueden servir para inhibir el crecimiento de ciertas especies bacterianas no deseadas haciendo que el medio se vuelva selectivo:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Colorantes anilínicos (por ejemplo: verde brillante y eosina). 2. Metales pesados (por ejemplo: bismuto). 3. Sustancias químicas (por ejemplo: azida, citrato, desoxicolato, selenito y alcohol feniletílico). 4. Fármacos antimicrobianos (por ejemplo: neomicina, colistina, vancomicina y cloranfenicol). <p>Sus concentraciones relativas son importantes para determinar la selectividad del medio en que se encuentran.</p>
Indicadores de pH	<p>La fucsina, azul de metileno, rojo neutro, rojo fenol y violeta de bromocresol son indicadores que se utilizan con frecuencia en los medios para medir los cambios de pH que resultan a partir del metabolismo bacteriano de dichos sustratos.</p>
Otros indicadores	<p>Se pueden incluir otros indicadores para detectar productos bacterianos específicos (por ejemplo: iones férricos y ferrosos para la detección de sulfuro de hidrógeno).</p>
Otros compuestos y sustancias químicas.	<p>Se agregan con frecuencia agar, un extracto gelatinoso de una alga roja, a un medio, en concentraciones variadas, como agente solidificante. Se emplean concentraciones del 1-2% para los medios de siembra, concentraciones del 0.05-0.3% para los medios semisólidos para motilidad y se agregan cantidades más pequeñas a los medios de caldo para anaerobios, a fin de prevenir las corrientes de convección y la penetración del oxígeno. Con frecuencia se agrega tiosulfato de sodio para brindar una fuente de sulfuro.</p>

(Koneman, 2017)

1.2.-Clasificación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se pueden clasificar teniendo en cuenta 3 parámetros: 1) Composición 2) Estado físico y 3) Función. La clasificación que nos interesa en este momento es la del estado físico; según su estado físico, se clasifican en sólidos, semisólidos y líquidos.

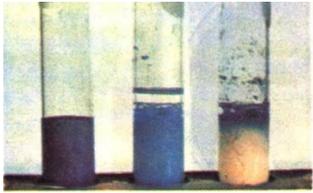
Los medios sólidos se utilizan con frecuencia para el aislamiento de varios microorganismos en una muestra. Su consistencia se debe al agar, un polisacárido ácido proveniente de

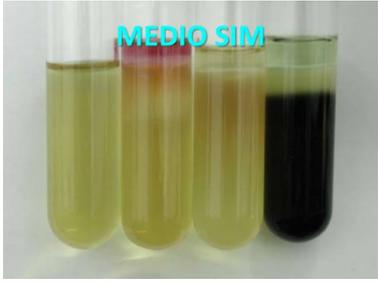
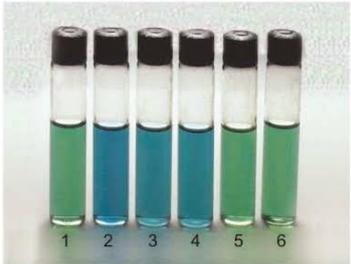
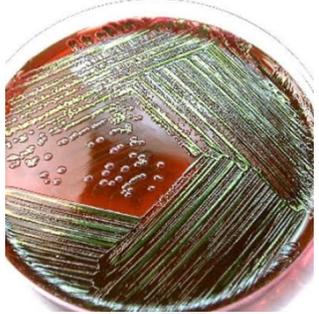
algunas algas rojas marinas. La mayoría de las bacterias no pueden degradar el agar, por esto ha sido ampliamente utilizado en microbiología (Kenneth,2017).

Los medios semisólidos contienen una menor proporción de agar que los medios sólidos (0,5% o menos). Se utilizan para evaluar la motilidad de los microorganismos, mantenimiento de cepas y propagación de anaerobios. Por motivos prácticos, se preparan en tubo recto, y por su consistencia para la siempre se utiliza asa bacteriológica recta.

Por último, los medios líquidos se utilizan para pre enriquecimiento y recuperación de microorganismos a partir de una muestra dada. (Arregui, 2014)

Tabla No. 3 Clasificación de Pruebas bioquímicas y medio de cultivos.

COMPOSICIÓN	Sintéticos	
	Semisintéticos	 Cooked Meat
	Naturales	 Reducción de azul de metileno en medio lácteo para enterococos
	Sólidos	 AGAR CITRATO DE SIMMONS;

ESTADO FÍSICO	Semisólidos	
	Líquidos	 Malonatos
FUNCIÓN	Enriquecidos	 Agar Sangre
	Selectivos	 Agar EMB
	Diferenciales	 Agar MacConkey

Los microorganismos cuentan con diversos requisitos de crecimiento, las bacterias por su parte se clasifican en función de sus requerimientos atmosféricos, dentro de esta clasificación existen:

1. Aerobias estrictas, que crecen sólo en presencia de oxígeno
2. Anaerobias estrictas, que sólo crecen en ausencia de oxígeno
3. Facultativas, que crecen tanto en aerobiosis como en anaerobiosis
4. Microaerofílicas, que crecen mejor en una atmósfera con reducida concentración de oxígeno.
5. Capnofílicas, que requieren CO₂ adicional para crecer

Gran cantidad de bacterias pueden crecer en una atmósfera con tensión de oxígeno normal. Algunas pueden obtener el oxígeno directamente de varios sustratos, pero los microorganismos anaerobios estrictos sólo se desarrollan adecuadamente en una atmósfera sin oxígeno ambiental. En un punto intermedio, los microorganismos microaerófilos crecen mejor en condiciones atmosféricas parcialmente anaerobias (tensión de oxígeno muy reducida), mientras los anaerobios facultativos tienen un metabolismo capaz de adaptarse a cualquiera de las citadas condiciones.

Las bacterias también se clasifican en función de la temperatura necesaria para su crecimiento:

1. Psicofílicas, pueden crecer a bajas temperaturas entre 2 – 5°C (óptimo 10 – 30°C)
2. Mesofílicas, crecen a temperaturas entre 10 – 45°C (óptimo 30 – 40°C)
3. Termofílicas, crecen muy poco a 37°C (óptimo 50 – 60°C)

La mayoría de las bacterias encontradas en muestras clínicas, entre ellas las enterobacterias son Mesofílicas. (Nester, 2007)

Todos los medios de cultivo han de estar perfectamente estériles para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios. El sistema clásico para esterilizar los medios de cultivo es el autoclave (que utiliza vapor de agua a presión como agente esterilizante)

El desarrollo o cosecha de microorganismos obtenido en algún medio se designa como un cultivo. Cuando las bacterias de un cultivo son todas de la misma especie, se dice que son cultivos puros; cuando 2 o más especies de bacterias se desarrollan en un medio como un cultivo mixto. Las bacterias se cultivan en alguno de los siguientes tipos de material, una vez limpio y esterilizado:

1. Tubos de ensayo
2. Cajas o placas Petri
3. Matraces de Florencia o Erlenmeyer
4. Tubos de fermentación

Las temperaturas óptimas de incubación de las bacterias son diferentes La mayoría de los microorganismos utilizados en el laboratorio así como los aislados de muestras clínicas crecen a una temperatura de 35°C, por ende se debe mantener la incubadora una temperatura promedio de 35 – 37°C. (Nester, 2007)

Las bacterias pueden ser identificadas por medio de pruebas bioquímicas. En particular, las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* son fácilmente identificadas utilizando esta metodología, debido a su gran diversidad metabólica y a la alta capacidad fermentadora de carbohidratos.

1.3.-Enterobacteriaceae

La familia *Enterobacteriaceae* es un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. Esta familia de microorganismos se caracterizan por ser bacilos anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia.

Sus características más significativas son; bacilos gramnegativos, ya sea móviles con flagelos peritricos o no móviles; se multiplican en medios con peptona o extracto de carne sin que se añada cloruro de sodio u otros complementos; proliferan en medios aerobios y anaerobios (facultativos); fermentan en vez de oxidar la glucosa, a menudo produciendo gas; son catalasa positiva, oxidasa negativa y reducen nitrato a nitrito. Pueden diferenciarse a nivel de especie por un conjunto grande de pruebas bioquímicas.

Esta familia comprende las bacterias patógenas y no patógenas. Conviene recalcar que las características de patogenicidad relativa en las enterobacterias es su hábitat natural, que es el tracto gastrointestinal, se modifican radicalmente cuando estas bacterias alcanzan una localización extra intestinal, en sitios como el tracto genitourinario, líquido cefalorraquídeo, torrente sanguíneo, médula ósea o la cavidad peritoneal.

En vista de lo anterior, es posible aislar y cultivar miembros de la familia *Enterobacteriaceae* tanto a partir de muestras fecales y productos que pudieron haber sufrido una contaminación fecal como el agua, alimentos, utensilios, etc.

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tubo digestivo. Su epidemiología se basa en individuos hospitalizados o inmunodeprimidos (incluyendo pacientes alcohólicos y diabéticos), en especial en los pacientes que reciben tratamiento antibiótico, hay colonización por enterobacterias.

Son organismos Gram negativos que poseen una membrana interna (citoplasmática), una cubierta de peptidoglicano que la rodea, y una compleja membrana externa (pared celular) que comprende la cápsula y que contiene lipopolisacáridos y porinas (canales para la penetración de antibióticos y nutrientes). Poseen además una serie de factores de virulencia que son esenciales para la producción de los diferentes síndromes clínicos.

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son microorganismos con forma de bastón, por lo general de 1-3 nm de largo, y 0,5 nm de diámetro. La membrana interna consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas, La capa siguiente, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos ,

lipoproteínas, proteínas porinas multiméricas, y otras proteínas de la membrana externa. (Molina, 2019)

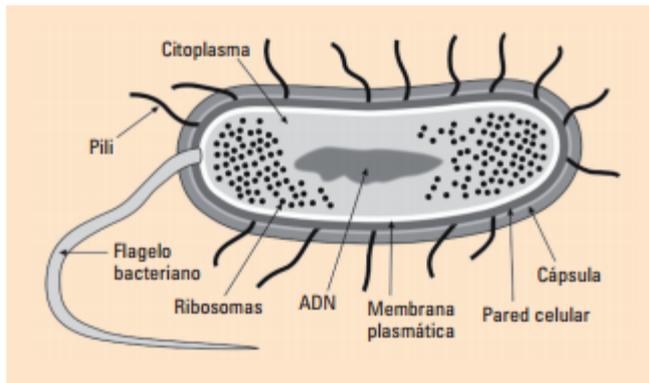


Imagen 1. Estructura del género *Enterobacteriaceae*.

Diferentes factores han contribuido al incremento de las infecciones por enterobacterias en hospitales: el uso cada vez mayor de técnicas diagnósticas y terapéuticas agresivas (catéteres intravenosos, endoscopias, intervenciones), el empleo de potentes inmunosupresores y las estancias hospitalarias prolongadas, entre otros. Por lo tanto su identificación a través de pruebas bioquímicas es necesario.

La mayor parte de las pruebas usadas para evaluar la actividad bioquímica o metabólica de bacterias, se lleva a cabo mediante el subcultivo del aislamiento primario en una serie de medios diferenciales, cuyos resultados pueden interpretarse. Las pruebas bioquímicas se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o alguna vía metabólica específica, crecimiento en presencia de inhibidores, etc. Las pruebas se basan en diferencias metabólicas entre las bacterias; en general se utilizan medios de cultivo con diferentes sustratos, así como un indicador de pH que permite la lectura de la prueba al observarse un cambio en la coloración. (Bailón.2003)

Las diferencias metabólicas entre bacterias se basan en diferencias genéticas y es por ello que las pruebas bioquímicas son una vía rápida y práctica para llevar a cabo una identificación bacteriana adecuada.

Las pruebas bioquímicas se emplean para identificar de forma clara y precisa, la presencia o ausencia de una enzima, de un grupo de enzimas, o de una vía metabólica completa en uno o más microorganismos. En el mercado existen técnicas rápidas, una de las más usadas para identificación de bacterias son las galerías API de bioMérieux^{MR}, las cuales permiten identificar levaduras, bacterias entéricas, no entéricas, y otras más. En el laboratorio se emplean frecuentemente las galerías API 20E, que es un sistema estandarizado que permite la identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos gramnegativos no exigentes; el inconveniente de este sistema es el costo, motivo por el cual se busca micro estandarizar las pruebas bioquímicas secundarias para enterobacterias. (Mahon, 2015)

1.4.-Fundamentos de las pruebas bioquímicas.

La identificación de enterobacterias se lleva a cabo regularmente con pruebas bioquímicas específicas, como es la serie IMVIC (Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer, Citratos), así como una serie de pruebas adicionales que permiten un reconocimiento adecuado de los microorganismos. La prueba de indol, tiene como fundamento la síntesis de triptofanasa por parte de las bacterias, esta se encarga de la degradación metabólica del aminoácido triptófano, produciendo indol ácido pirúvico y amoniaco. La detección del indol liberado al medio se lleva a cabo empleando el reactivo de Kovacs, el cual contiene un aldehído que reacciona con el indol generando un anillo de color rojo en la superficie. (Murra, 2018)

1.4.1.-Rojo de Metilo, Voges Proskauer

Por su parte, la pruebas de Rojo de Metilo y Voges Proskauer son un par de pruebas combinadas que se utilizan para determinar la capacidad de un microorganismo de generar y mantener productos finales ácidos estables por fermentación de la glucosa, para superar la capacidad amortiguadora del sistema, y para determinar la capacidad de algunos microorganismos de elaborar productos finales neutros a partir de la fermentación de la glucosa (Forbes, 2009).

1.4.1.1.-Rojo de Metilo

La prueba de rojo de metilo se basa en el empleo de un indicador de pH para determinar la concentración de iones de hidrógeno presentes cuando un organismo fermenta la glucosa. Las bacterias RM positivas producen ácidos estables manteniendo una alta concentración de iones hidrógeno hasta alcanzar cierta concentración. La validez de la prueba de RM depende de un tiempo de incubación suficiente como para permitir que se produzca la diferencia en el metabolismo de la glucosa. Los organismos en estudio se incubaran por lo menos 48 horas, lo que permite que todos los organismos con baja proporción gaseosa muestran su límite en la concentración de iones hidrógeno. (Mahon, 2015)

1.4.1.2.-Voges Proskauer

La reacción de VP se basa en la detección de acetoína como producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. Esta es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave en la glucólisis. A partir del ácido pirúvico, una bacteria puede seguir innumerables vías.

Las bacterias que utilizan esta vía producen solo pequeñas cantidades de ácidos mixtos que son insuficientes para disminuir el pH del medio rojo de metilo, lo suficiente como para producir un cambio de color. Por este motivo muchas de las especies de Enterobacterias son VP positivas, pocas excepciones son RM negativas y viceversa.

El primer reactivo agregado a una alícuota incubada es el catalizador alfa-naftol porque este actúa como intensificador del color, lo que aumenta la sensibilidad de la reacción sin la pérdida de su especificidad. El segundo reactivo es el KOH 40% que cuando se agrega al medio de VP contribuye a la absorción de CO₂. El KOH 40% reaccionara con la peptona dando un anillo en la superficie color rosado salmón.

El orden de la adición de los reactivos es importante, ya que la inversión de incorporación dará como resultado un débil positivo o falso negativo. El volumen debe ser muy exacto ya que el exceso puede ocultar la reacción VP débilmente positiva, por esta razón, en las pruebas realizadas con el nuevo material se observa claramente las reacciones positivas o débilmente positivas. (Bailón. 2003)

1.4.2.- MIO (Motilidad Indol Ornitina)

Entre las pruebas utilizadas en la identificación de miembros de la familia Enterobacteriaceae, se encuentra el medio MIO, que se basa en la movilidad, producción de indol y la determinación de la actividad enzimática de la enzima ornitina descarboxilasa.

Este medio de cultivo es altamente nutritivo por la presencia de extracto de levadura, peptona y tripteina. La tripteina aporta gran cantidad de triptófano, sustrato de la enzima triptofanasa a partir de la cual se forma indol, que puede ser revelado con reactivo de Ehrlich o de Kovac's generando un anillo de coloración roja.

La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, la ornitina es el sustrato para la detección de la enzima ornitina descarboxilasa, el purpura de bromocresol es el indicador de pH, que en medio alcalino es de color purpura y en medio ácido es amarillo. El agar es el agente solidificante y a esta concentración le otorga al medio la propiedad de ser semisólido, condición necesaria para detectar movilidad, que se evidencia por el enturbiamiento del medio o por crecimiento que difunde más allá de la línea de inoculación del microorganismo en estudio. (MIO Medio Britania lab, Recuperado 12 de Marzo de 2022)

Los microorganismos fermentadores de glucosa acidifican el medio de cultivo y producen viraje del color púrpura al amarillo. Las condiciones de acidez son favorables para la actividad enzimática ornitina decarboxilasa, que actúa sobre la ornitina generando putrescina, con la consecuente alcalinización del medio de cultivo y viraje al color púrpura (MIO Medio Britania lab, Recuperado 12 de Marzo de 2022)

1.4.3.- Citrato de Simmons

La prueba de citrato de Simmons, por otro lado, tiene como objetivo determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento con alcalinidad resultante. En condiciones normales, el metabolismo del citrato involucra una condensación de acetilo con coenzima A y oxalacetato para ingresar en el ciclo de Krebs. El metabolismo del citrato por la mayoría de las bacterias es rápido por la vía del ácido tricarbónico o el camino metabólico de la fermentación del citrato.

El desdoblamiento del citrato comprende un sistema enzimático sin la intervención de la coenzima A. Esta enzima se denomina citratasa o citrato desmolasa.

Los productos del metabolismo del citrato dependen del pH del medio. A un pH alto se producen acetato y formato y disminuye la producción de lactato y CO₂.

A un pH ácido, los principales productos del metabolismo del citrato son acetilmetilcarbinol y lactato. Sin tener en cuenta los productos finales producidos, el primer paso metabólico en la

fermentación del citrato produce piruvato. La degradación del piruvato depende entonces del pH del medio. (MacFaddin. 2003).



Imagen 2. Pruebas bioquímicas IMVIC

Existe un considerable número de pruebas bioquímicas, entre ellas se encuentran las descarboxilasas cuyo objetivo es determinar la capacidad de un microorganismo para descarboxilar un aminoácido para formar una amina con la resultante alcalinidad. La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas atacan a los aminoácidos en su carboxilo terminal para formar una amina o una diamina y dióxido de carbono.

1.4.4.- LIA (Lisina Hierro Agar)

La prueba Lisina descarboxilasa, por fermentación de la glucosa las enterobacterias producen ácido, el cual hace virar el indicador a color amarillo. Si la bacteria posee una lisina descarboxilasa, por la descarboxilación de la lisina se producirá una amina, la cual neutraliza el ácido producido por la fermentación de la glucosa retornando el medio a su color original violeta.

La lisina puede ser descarboxilada por microorganismos LD- positivos, que la transforman en la amina cadaverina. Puesto que la descarboxilación solo tiene lugar en medio ácido, es necesario que se produzca previamente la acidificación del medio de cultivo, por fermentación de la glucosa. Por este motivo, este medio de cultivo sólo puede usarse para la diferenciación de cultivos fermentadores de glucosa.



Imagen 3. Prueba bioquímica; LIA.

1.4.5.- Malonatos

La utilización de malonato, pone de manifiesto la capacidad que poseen determinadas bacterias de utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono, con la consiguiente liberación del catión, que en presencia de iones agua produce alcalinidad. Solamente los microorganismos que pueden usar simultáneamente malonato de sodio como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno son capaces de ejercer una acción tampón produciendo hidróxido de sodio. El aumento de la alcalinidad resultante hace que el azul de bromotimol cambie de verde a azul. Los microorganismos malonato negativos que fermentan glucosa hacen que el indicador cambie de verde a amarillo. Se utiliza en la diferenciación de especies entre la familia *Enterobacteriaceae*. (Madigan, 2009)



Imagen 4. Prueba bioquímica; Malonatos.

1.4.6.- Caldo Urea de Stuart

A su vez, los microorganismos que tienen la enzima ureasa hidrolizan la urea, liberan amoníaco y producen un cambio de color rojo-rosado en el medio. La hidrólisis de la urea por la enzima ureasa forma dióxido de carbono y libera dos moléculas de amoníaco que alcaliniza el medio, provocando el vire del indicador rojo de fenol, generando una coloración rosa buganvilia en caso de ser positiva.

Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa, sobre todo, para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan una reacción negativa o positiva retardada.

La urea es hidrolizada por aquellos microorganismos capaces de producir la enzima ureasa, produciendo dos moléculas de amoníaco que en solución se hidrolizan a carbonato de amonio alcalinizando el medio, con el consecuente cambio de color del indicador rojo de fenol de amarillo naranja a rojo-fucsia. (Farias.2015)

La ureasa es una importante enzima microbiana relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos. Las enzimas bacterianas se clasifican como constitutivas o adaptativas. Una enzima adaptativa o inducida se produce sólo cuando su sustrato específico está presente. La ureasa es considerada como constitutiva debido a que es sintetizada por

ciertas bacterias sin tomar en consideración la presencia o la ausencia de su sustrato, la urea. (MacFaddin. 2003)

Para la detección de la enzima ureasa se desarrollaron 2 medios: Urea de Christensen y Urea de Stuart. El primero tiene menos amortiguador y pone de manifiesto una actividad de ureasa más débil, de forma inmediata. Por su parte el segundo, es más tamponado y, por lo tanto, detecta las bacterias con mayor actividad de ureasa. (Rodríguez. 2005)

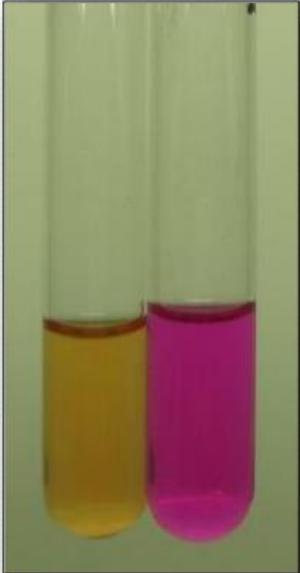


Imagen 5. Prueba bioquímica; Urea.

1.4.7.- Fenilalanina

Por su parte, la prueba de fenilalanina desaminasa tiene como objetivo determinar la capacidad de un microorganismo para desaminar la fenilalanina a ácido fenilpirúvico por vía enzimática, con la producción de acidez.

El aminoácido aromático fenilalanina es desaminado por un mecanismo oxidativo por una aminoácido oxidasa, una flavoproteína, para producir un cetoácido, el ácido fenilpirúvico. La desaminación oxidativa elimina el grupo amino (NH_2) del aminoácido para formar un enlace doble alfa-cetoácido y amoníaco libre (NH_3). Este es un proceso de dos pasos: en un inicio, se elimina el hidrógeno, lo que produce un aminoácido y el hidrógeno se combina con el oxígeno para formar agua; luego el aminoácido es hidrolizado a un cetoácido. (McFaddin.2003)

Para llevar a cabo la lectura de la reacción es necesario utilizar un reactivo llamado Cloruro férrico en solución acuosa al 10%, del cual se deben agregar 4-5 gotas directamente al tubo incubado durante 18 - 24 horas. Una vez agregado el reactivo ocurre una reacción positiva de color verde en 1 – 5 minutos en el pico de flauta y en el líquido de condensación.

El FeCl_3 es un agente quelante; produce la quelación con el ácido fenilpirúvico para formar un color verde. La exposición de un tubo de cultivo con fenilalanina al oxígeno atmosférico después del agregado de FeCl_3 incrementa la velocidad de producción y la intensidad de una reacción positiva. (Barer, 2019)



Imagen 6. Prueba bioquímica; Fenilalanina desaminasa

1.4.8.- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)

Otra de las pruebas de importancia dentro del laboratorio, es la prueba de Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), este agar es usado para la diferenciación de bacilos Gram negativos entéricos basado en la fermentación de carbohidratos (sacarosa, lactosa y dextrosa) y la producción de ácido sulfhídrico.

Este agar contiene 3 azúcares. Dextrosa, lactosa y sacarosa; rojo de fenol para detectar la fermentación de estos carbohidratos, y sulfato ferroso para detectar la producción de ácido sulfhídrico.

La degradación o fermentación del azúcar con formación de ácido se manifiesta por un cambio de color del indicador rojo de fenol que vira de anaranjado-rojizo a amarillo, o por un viraje a rojo intenso en caso de alcalinización. El tiosulfato es reducido por algunos microorganismos a ácido sulfhídrico, el cual reacciona con la sal férrica produciendo sulfuro de hierro de color negro.

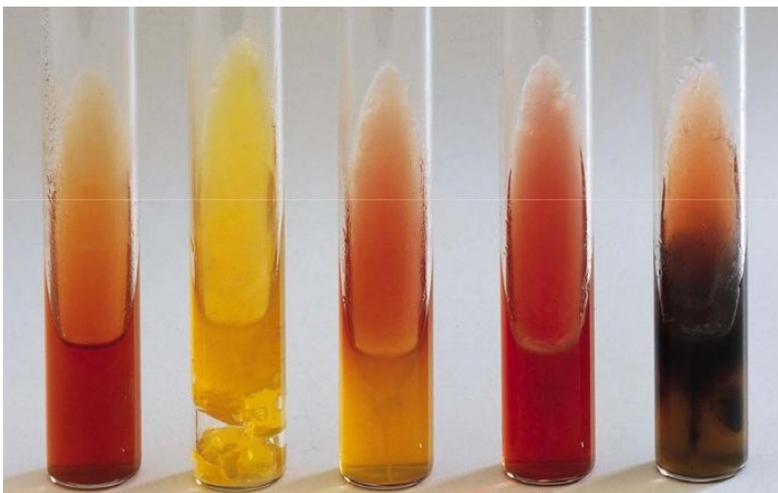


Imagen 7. Prueba bioquímica, TSI (Triple Sugar Iron Agar)

1.4.9.-Agar Hierro de Kligler (KIA)

De manera similar se utiliza la prueba KIA, para la identificación de enterobacterias basada en la fermentación de dos azúcares (dextrosa y lactosa) y la producción de ácido sulfhídrico. Su uso se recomienda para la identificación de enterobacterias Gram negativas productoras de H₂S.

El agar hierro de Kligler contiene dos carbohidratos; la lactosa al 1% y la glucosa al 0.1%. La fermentación del azúcar produce ácido que se observa por el cambio del indicador rojo de fenol al color amarillo. Cuando la fermentación se produce en condiciones aeróbicas tanto para la lactosa como para la glucosa, se observa en la zona de pico de flauta, cuando es en anaerobiosis se observa en la capa inferior del tubo y solo es para la glucosa. (Farias.2015)

La fermentación es un proceso metabólico de óxido-reducción que ocurre en un medio ambiente anaerobio y, en lugar de oxígeno, un sustrato orgánico sirve como el aceptor final de hidrógeno. En los sistemas de prueba bacteriológicos, este proceso se detecta observando cambios de color en indicadores de pH a medida que se forman productos ácidos. Las bacterias que fermentan un hidrato de carbono son por lo general anaerobios facultativos. Por medio del proceso de fermentación un hidrato de carbono es degradado y descompuesto en 2 moléculas de carbono que son nuevamente degradadas en un número de compuestos de 1,2,3 y 4 carbonos. Los productos finales varían con cada especie bacteriana y depende del sistema enzimático existente en la especie y las condiciones del medio ambiente. (Arregui, 2014)

Durante este procedimiento, específicamente para las pruebas de agar sólido o en forma de pico de flauta, se llevó a cabo un tratamiento especial, pues dentro de los estándares establecidos en el laboratorio de microbiología de la facultad, se utilizan 3 ml de agar por tubo, por nuestra parte utilizamos inicialmente tubos con 0.9 ml donde no se observó claramente el vire del indicador, ni las características esenciales de cada microorganismo para estas pruebas.

Por lo tanto se modificó el proceso, utilizando esta vez tubos de mayor capacidad en los que se utilizó únicamente 1.5 ml de agar por tubo. Observando de esta manera el cambio del indicador, así como la producción de gas y H₂S respectivamente.



Imagen 8. Prueba bioquímica; KIA (Kligler Iron Agar)

1.4.10.- Nitratos

Dentro de las pruebas bioquímicas que existen, hay algunas que complementan la batería de pruebas necesarias para la identificación correcta de enterobacterias. Entre ellas se encuentra la prueba de reducción de nitratos, la cual se fundamenta en determinar la capacidad de las bacterias para reducir los nitratos convirtiéndolos en nitritos o en nitrógeno, es decir, se estudia la presencia de la enzima nitrato reductasa y nitrito reductasa.

Se utiliza el medio de cultivo caldo de nitratos. Para revelar la presencia de nitritos en el medio se emplearon 2 reactivos: Ácido sulfaminico al 0,8% en ácido acético glacial 5N y alfa-naftilamina al 0,5% en ácido acético glacial 5N que se añaden luego de la incubación.

Si los nitratos han sido reducidos, el caldo de cultivo vira a un color rojo intenso por la presencia de nitritos. (Castro, 2014)

Todas las pruebas bioquímicas previamente mencionadas, son consideradas como un medio de cultivo, el cual se entiende como un preparado estéril que contiene sustancias necesarias para el desarrollo de los microorganismos.

En su totalidad los microorganismos requieren agua, carbono, nitrógeno, hidrógeno, calcio, fósforo, y hierro como elementos vitales. Los microorganismos exigentes requieren además factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas, purinas y otras sustancias que no son capaces de sintetizar. (Cowan, 2004)

2.- Justificación.

Las bacterias de interés médico se diagnostican haciendo uso de diversas herramientas de laboratorio, entre ellas las tinciones y aislamientos en agares selectivos y diferenciales principalmente y el uso de pruebas bioquímicas que mediante reacciones específicas en el medio, permiten conocer características metabólicas de estos microorganismos, de los cuales

hacen posible su identificación en base a la bacteriología tradicional. El procedimiento de identificación bacteriana requiere del uso de grandes cantidades de materiales y reactivos que representan un costo elevado para la institución además de una inversión grande de tiempo en su preparación y generan una gran cantidad de desechos que deberán luego de ser inactivados y eliminados de acuerdo con las normas correspondientes tal como es la Norma Oficial Mexicana 087-ecol-ssa1-2002.

Los procesos de identificación anteriormente mencionados, son independientes de la cantidad o tamaño del medio de cultivo en que se realicen por lo que se propone el uso de nuevas metodologías en menor escala, que permitan a los estudiantes observar las mismas reacciones y características bioquímicas, disminuyendo el costo que representan las técnicas convencionales y a la vez, disminuir considerablemente la cantidad de desechos que se generan (principalmente plásticos de un solo uso) sin afectar la calidad y objetivos de la enseñanza.

3.- Objetivo general.

Estandarizar un micrométodo para la realización de las pruebas bioquímicas y sembrado en agares de las bacterias más importantes de interés médico por medio de ensayos en microplacas y microtubos con la finalidad de incrementar la eficiencia de estos procedimientos, mejorar los métodos de enseñanza y reducir el uso de materiales y reactivos que se emplean en el área de enseñanza en microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por lo que se igualará y de ser posible aumentar la eficacia de este micrométodo.

4.- Objetivos Particulares.

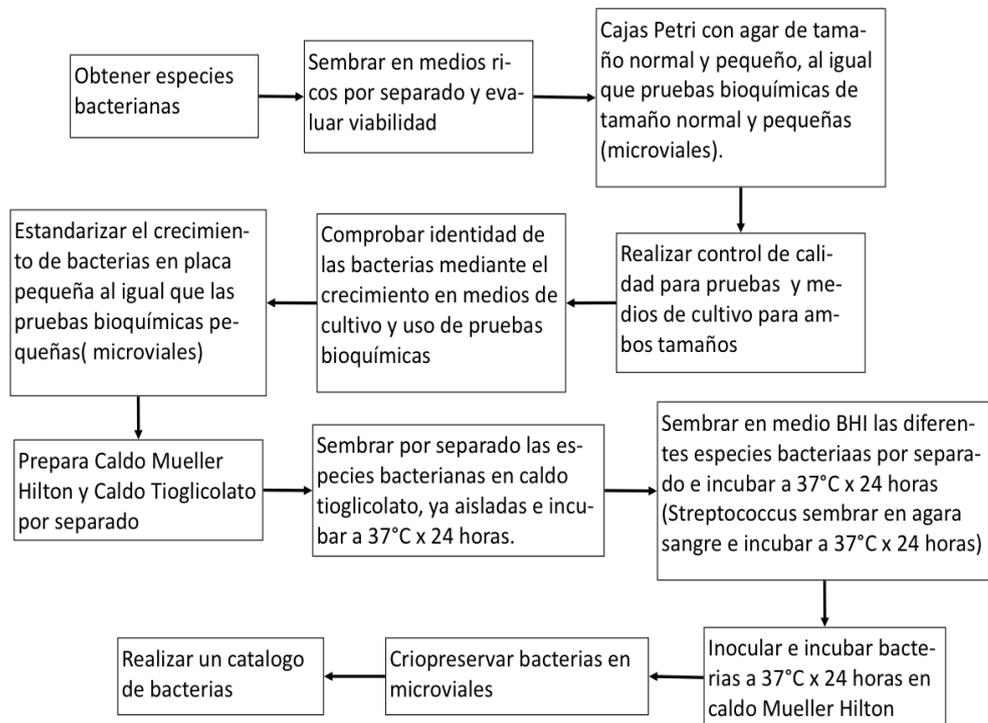
- Estandarizar la realización de pruebas bioquímicas en microtubos para diversas bacterias de interés médico.
- Estandarizar los principales medios de cultivo en microplacas para diversas bacterias de interés médico.
- Aumentar la eficacia en cuanto almacenamiento de medios de cultivo, al igual que para pruebas bioquímicas.
- Ser de utilidad para el diagnóstico , al igual como para la enseñanza.
- Reducir los residuos biológicos infecciosos y al igual que en el momento de inactivación sea mayor la carga de residuos por la misma cantidad de gas y tiempo requeridos que la normal.
- Reducir gasto en reactivos e instrumental dentro del laboratorio de microbiología.
- Realizar un catálogo de resultados de pruebas bioquímicas, morfología colonial, morfología microscópica y crecimiento en agar de las principales cepas de interés médico utilizadas en el área de enseñanza de Microbiología, perteneciente a la Sección de Ciencias de la Salud Humana, Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

5.- Materiales.

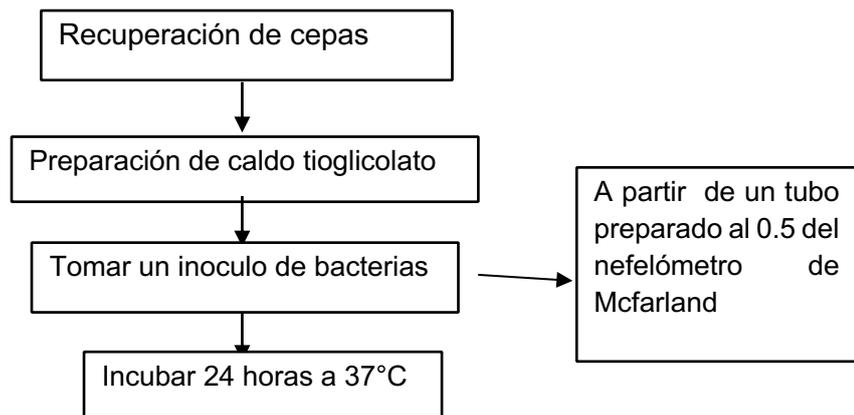
- Microplacas petri desechables
- Microtubos autoclavable
- Medios de cultivo deshidratados
- Cepas bacterianas de interés médico
- Asas bacteriológicas
- Tapones de gasa con algodón
- Baño maria
- Mecheros bunsen
- Gorros de papel para matraz erlenmeyer
- Tubos de taparroca de 13 x 100
- Palitos de madera
- Placas petri de 90 mm x 15 mm
- Reactivos de lectura
- Agua destilada
- Indicadores de pH
- Matraces Erlenmeyer
- Autoclave
- Bascula granataria
- Pipetas graduadas
- Latas de aluminio
- Papel estraza
- Bolsas rojas de RPBI

6.- Diagramas de proceso

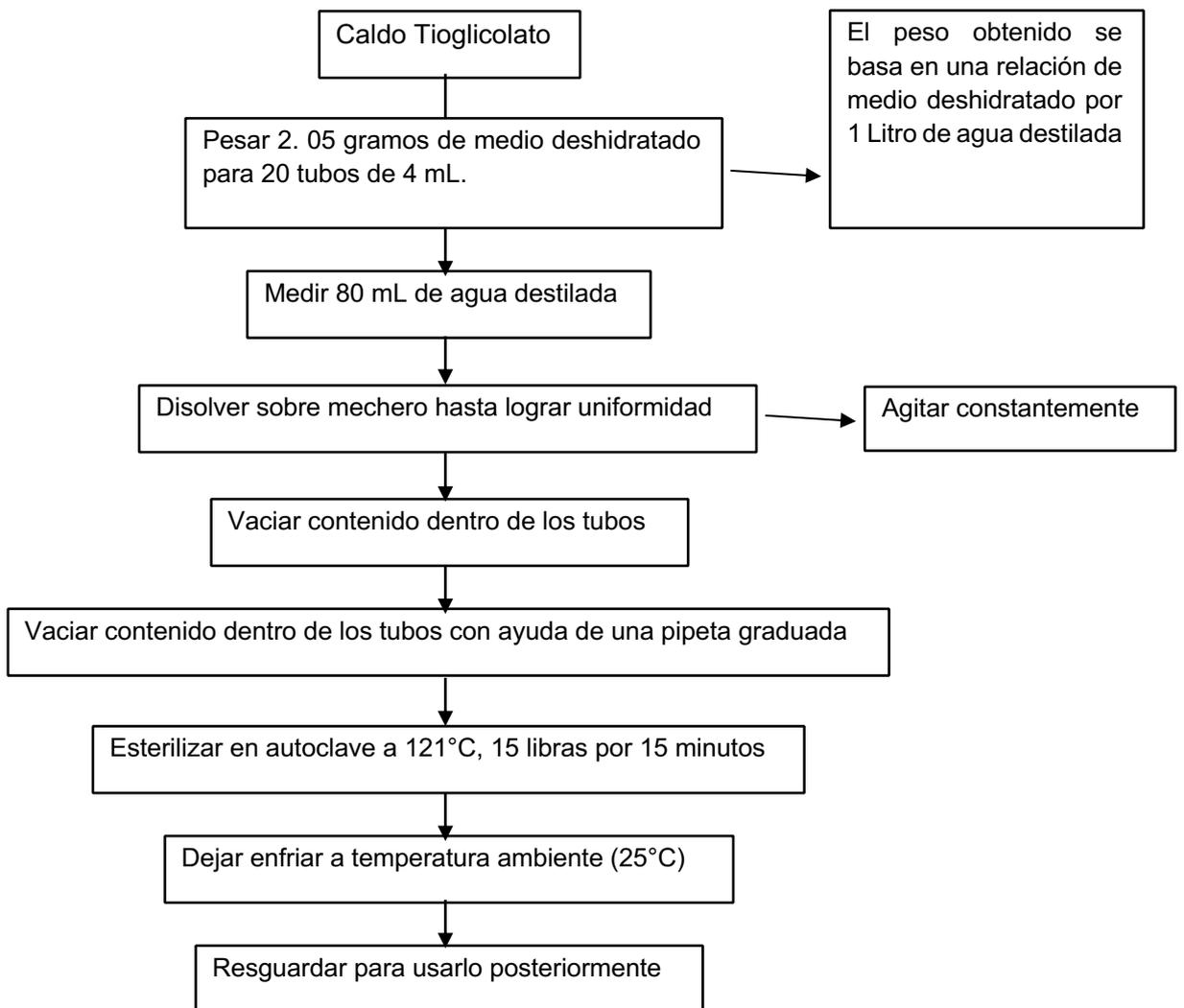
6.1.- Diagrama No.1 Organización general de trabajo



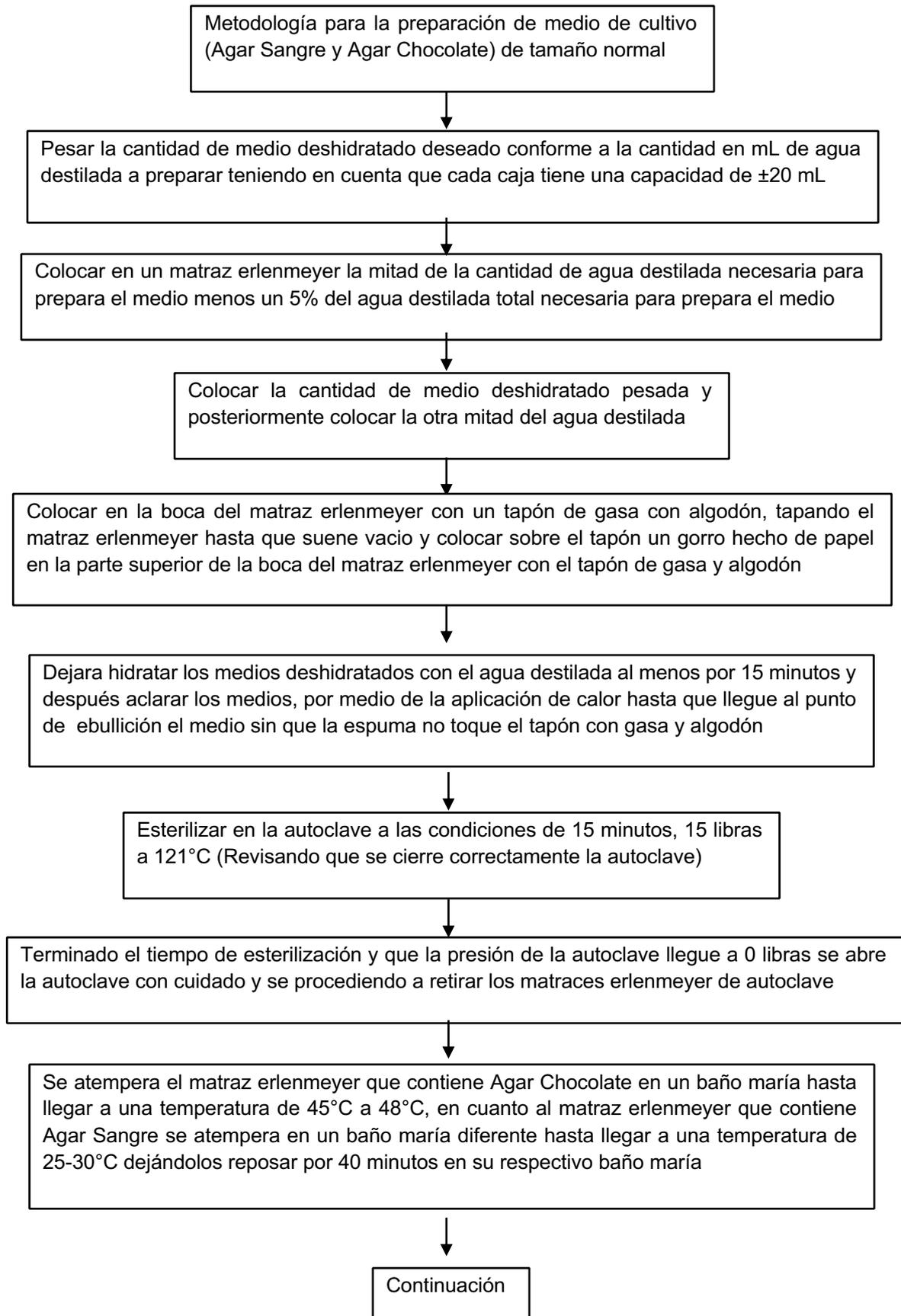
6.2.- Diagrama No.2 Proceso para recuperación de cepas



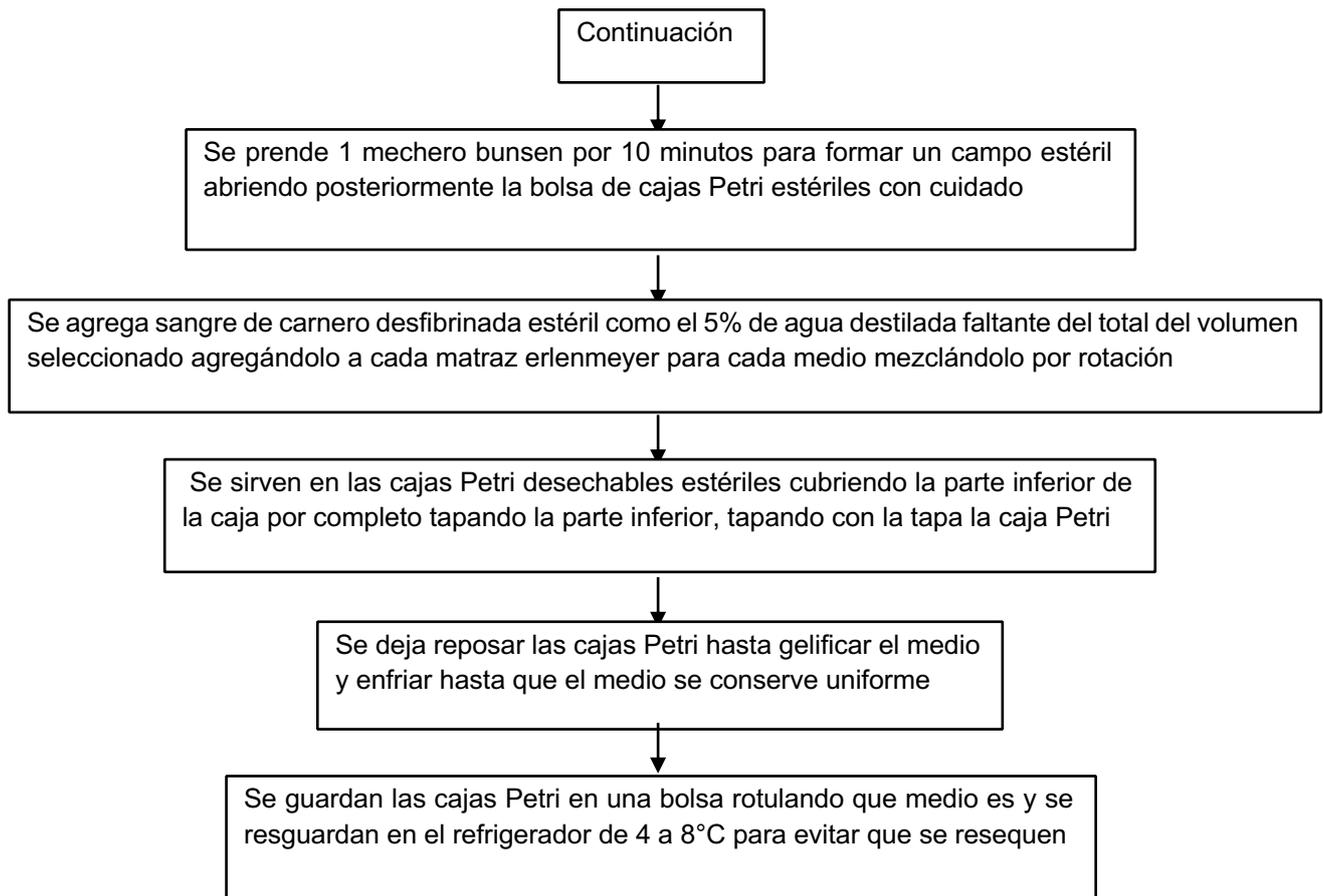
6.3.- Diagrama No. 3 Preparación de caldo tioglicolato



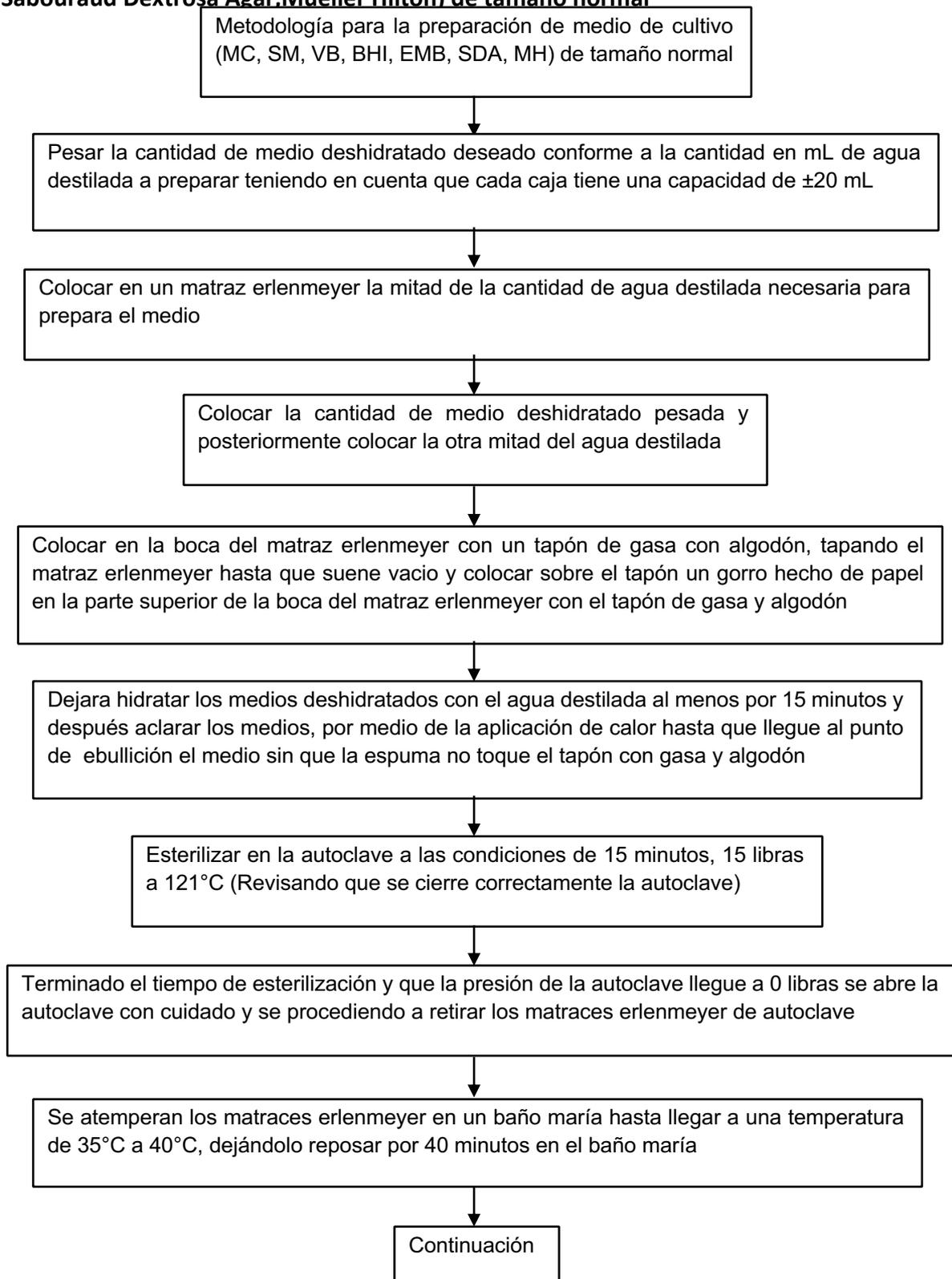
6.4.- Diagrama No.4 Metodología para la preparación de medios de cultivo agar Sangre y agar Chocolate de tamaño normal



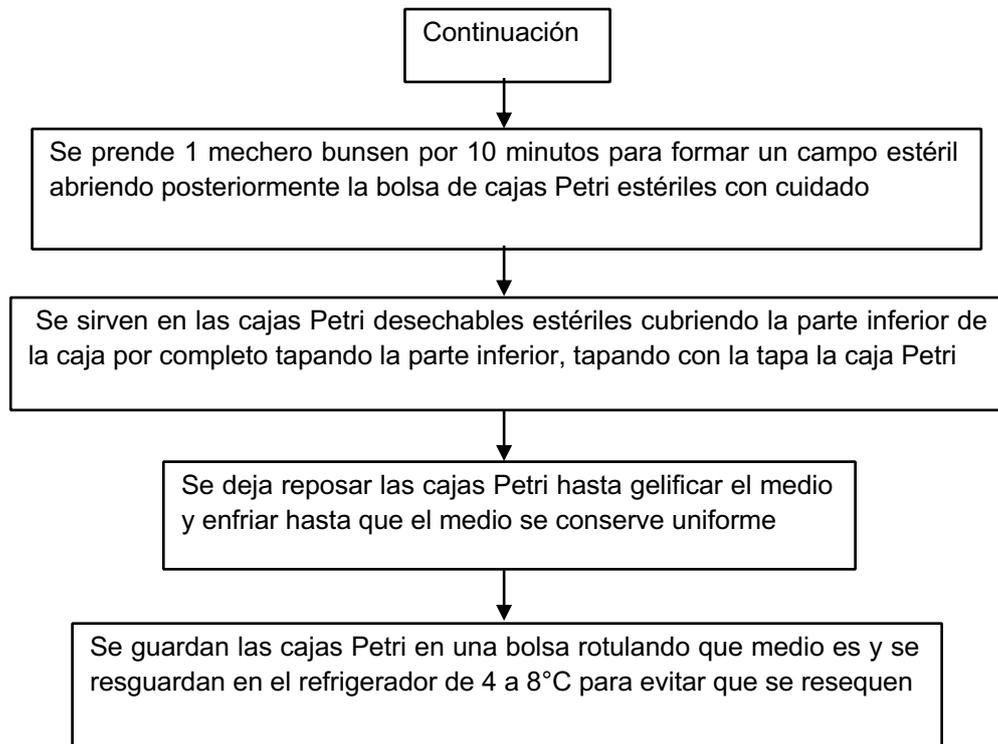
6.4.- Diagrama No.4 Metodología para la preparación de medios de cultivo agar Sangre y agar Chocolate de tamaño normal (continuación)



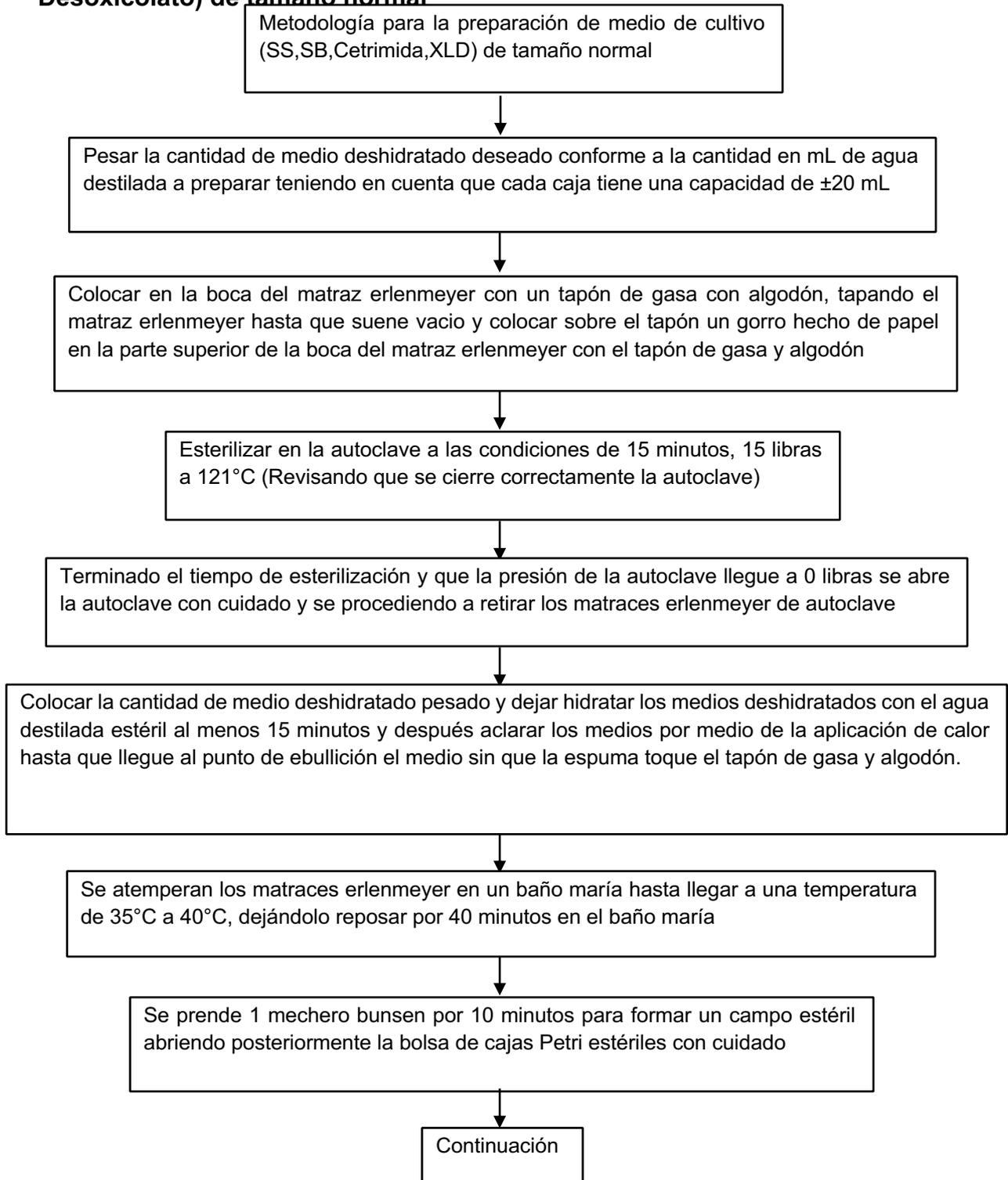
6.5.- Diagrama No.5 Metodología para la preparación de medios de cultivo (MacConkey, Sales y Manitol, Verde Brillante, Infusión Cerebro Corazón, Eosina Azul de Metileno, Sabouraud Dextrosa Agar, Mueller Hilton) de tamaño normal



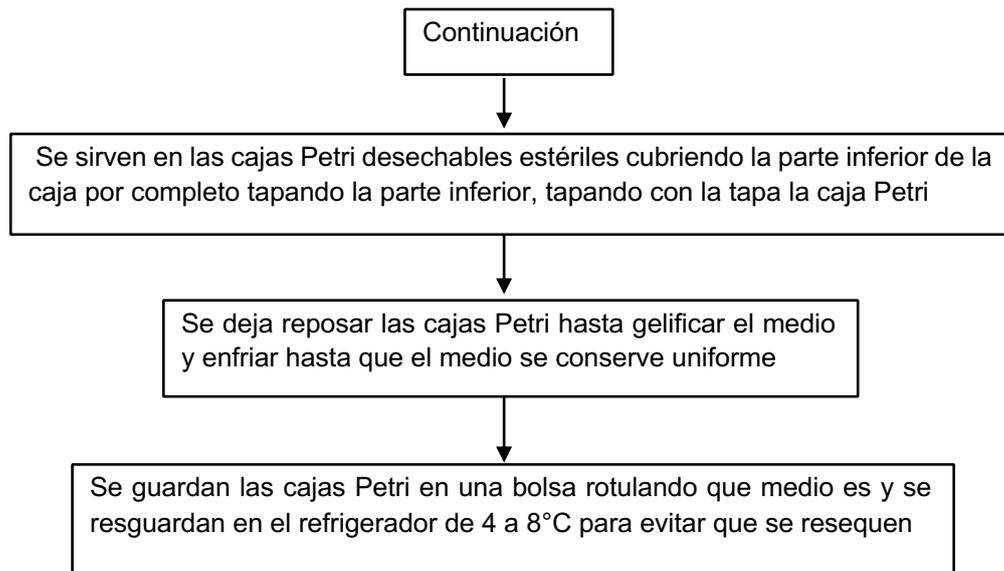
6.5.- Diagrama No.5 Metodología para la preparación de medios de cultivo (MacConkey, Sales y Manitol, Verde Brillante, Infusión Cerebro Corazón, Eosina Azul de Metileno, Sabouraud Dextrosa Agar, Mueller Hilton) de tamaño normal (continuación).



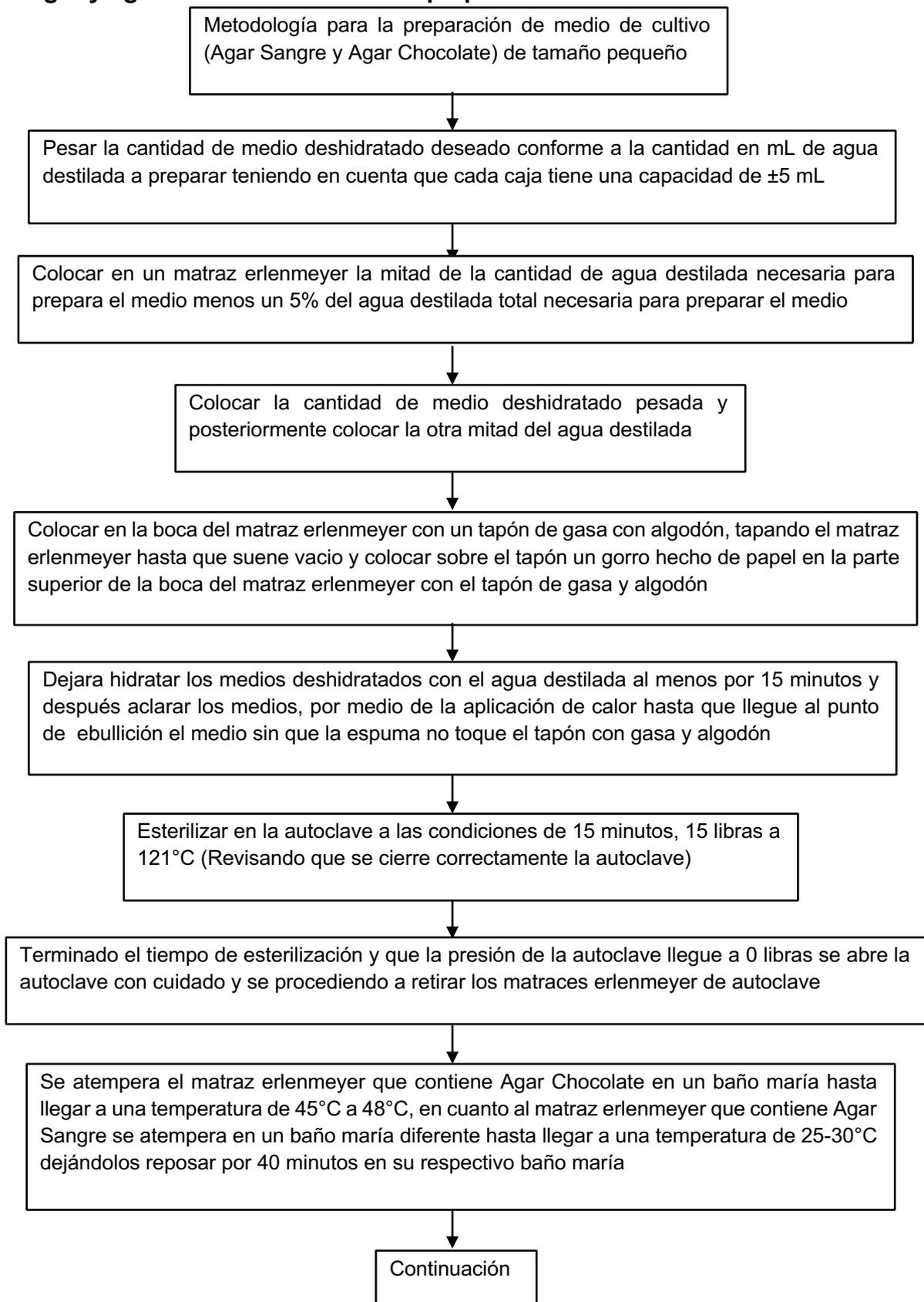
6.6.- Diagrama No.6 Metodología para la preparación de medios de cultivo (Salmonella-Shigella, Sulfito Bismuto, Cetrimida y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato) de tamaño normal



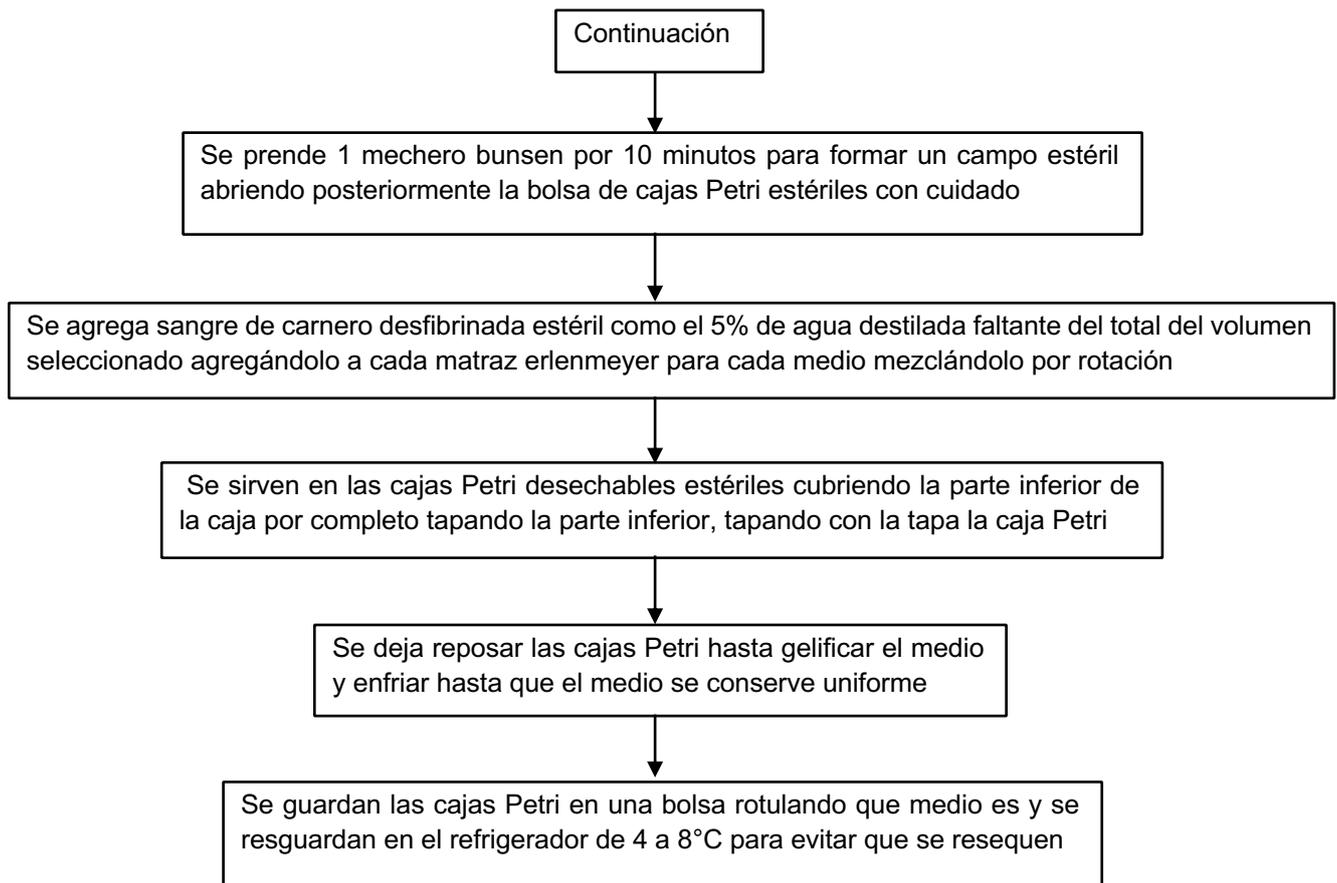
6.6.- Diagrama No.6 Metodología para la preparación de medios de cultivo (Salmonella-Shigella, Sulfito Bismuto, Cetrimida y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato) de tamaño normal (continuación)



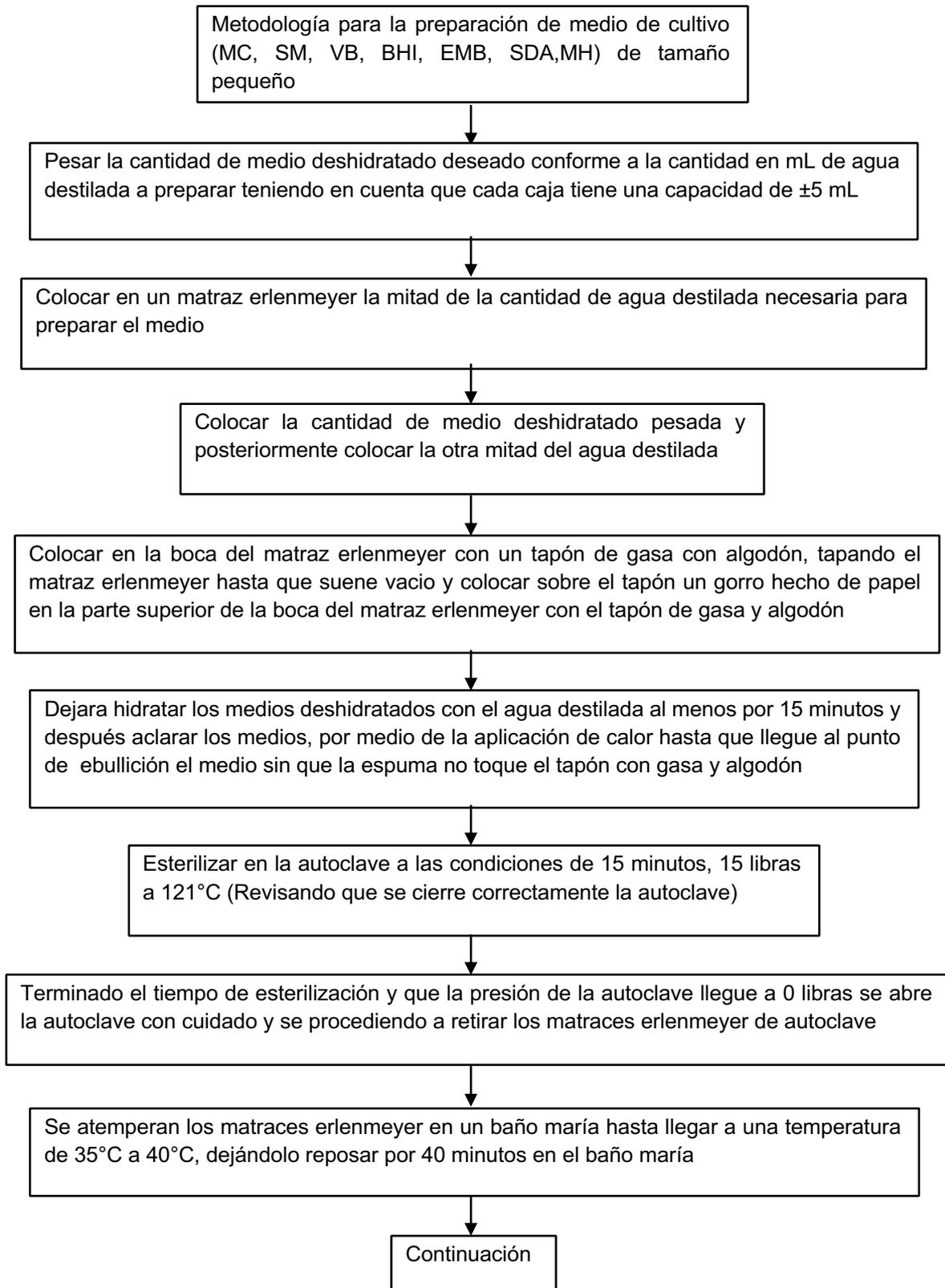
6.7.- Diagrama No.7 Metodología para la preparación de medios de cultivo agar Sangre y agar Chocolate de tamaño pequeño



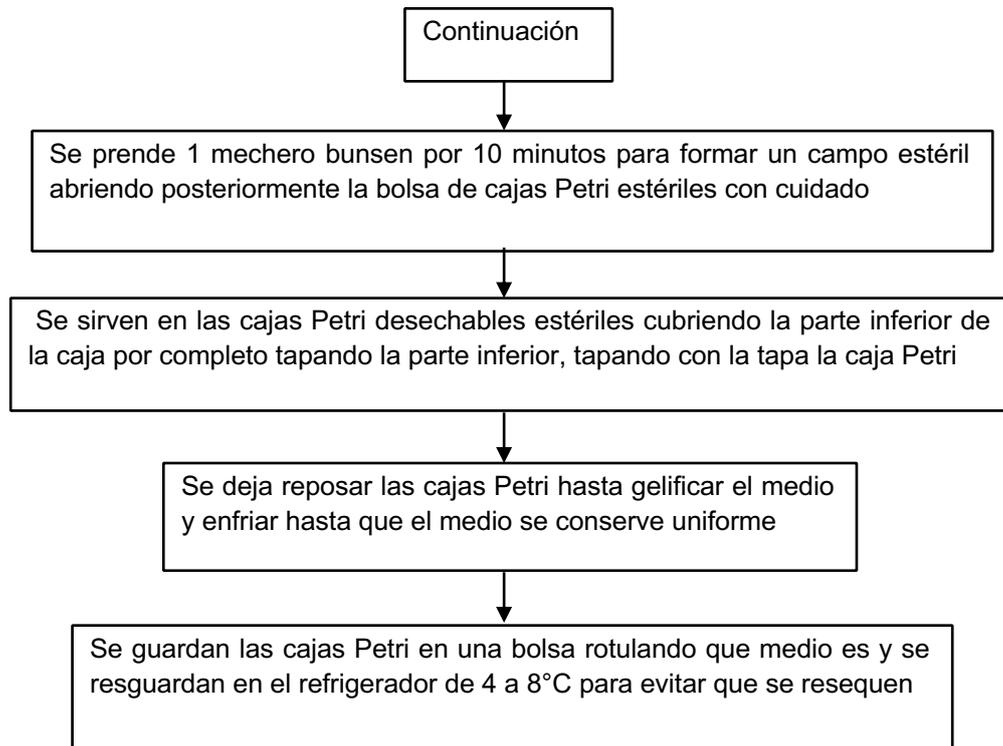
6.7.-Diagrama No.7 Metodología para la preparación de medios de cultivo agar Sangre y agar Chocolate de tamaño pequeño (continuación)



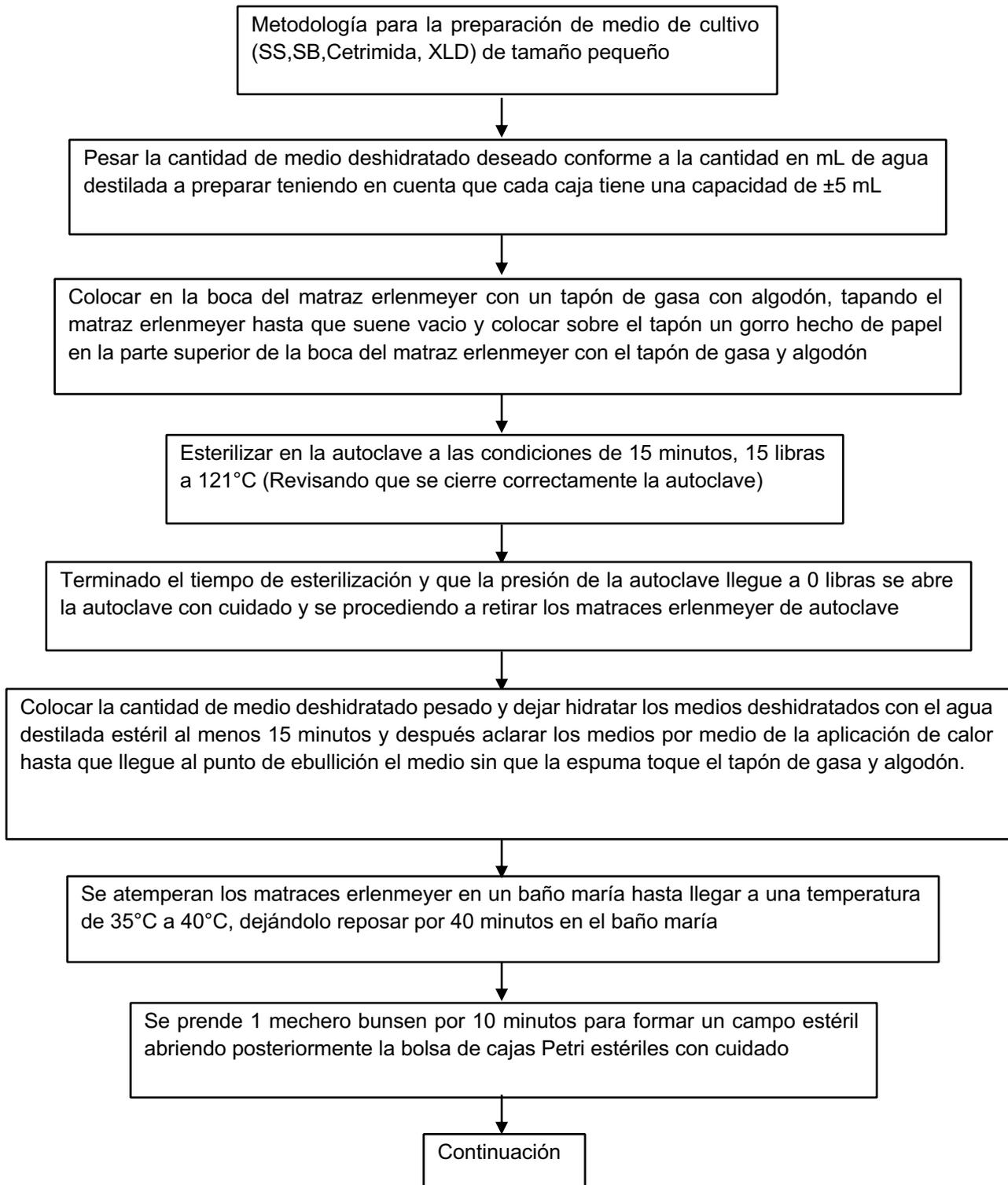
6.8.- Diagrama No.8 Metodología para la preparación de medios de cultivo (MacConkey, Sales y Manitol, Verde Brillante, Infusión Cerebro Corazón, Eosina Azul de Metileno, Sabouraud Dextrosa Agar, Mueller Hilton) de tamaño pequeño.



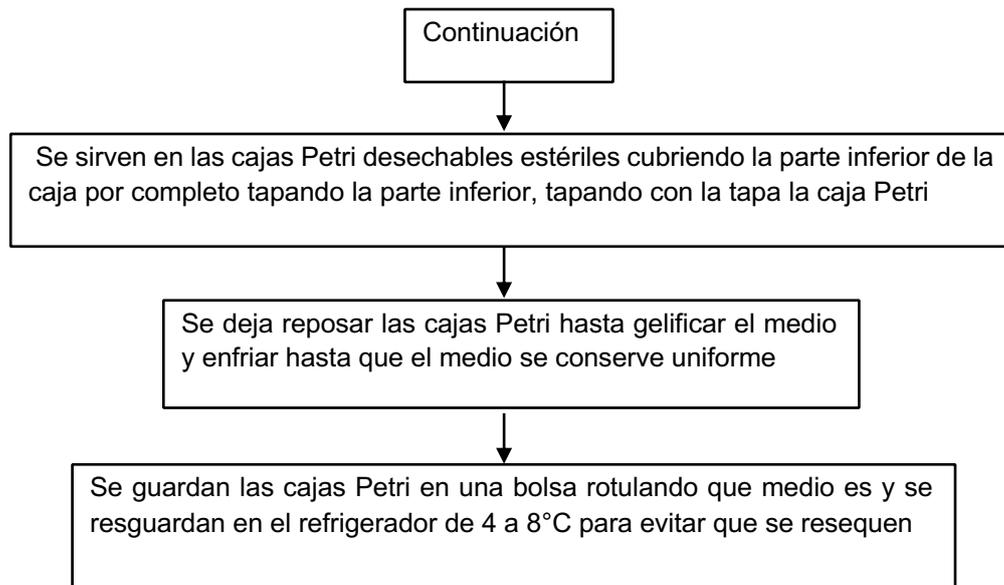
6.8.- Diagrama No.8 Metodología para la preparación de medios de cultivo (MacConkey, Sales y Manitol, Verde Brillante, Infusión Cerebro Corazón, Eosina Azul de Metileno, Sabouraud Dextrosa Agar, Mueller Hilton) de tamaño pequeño (continuación).



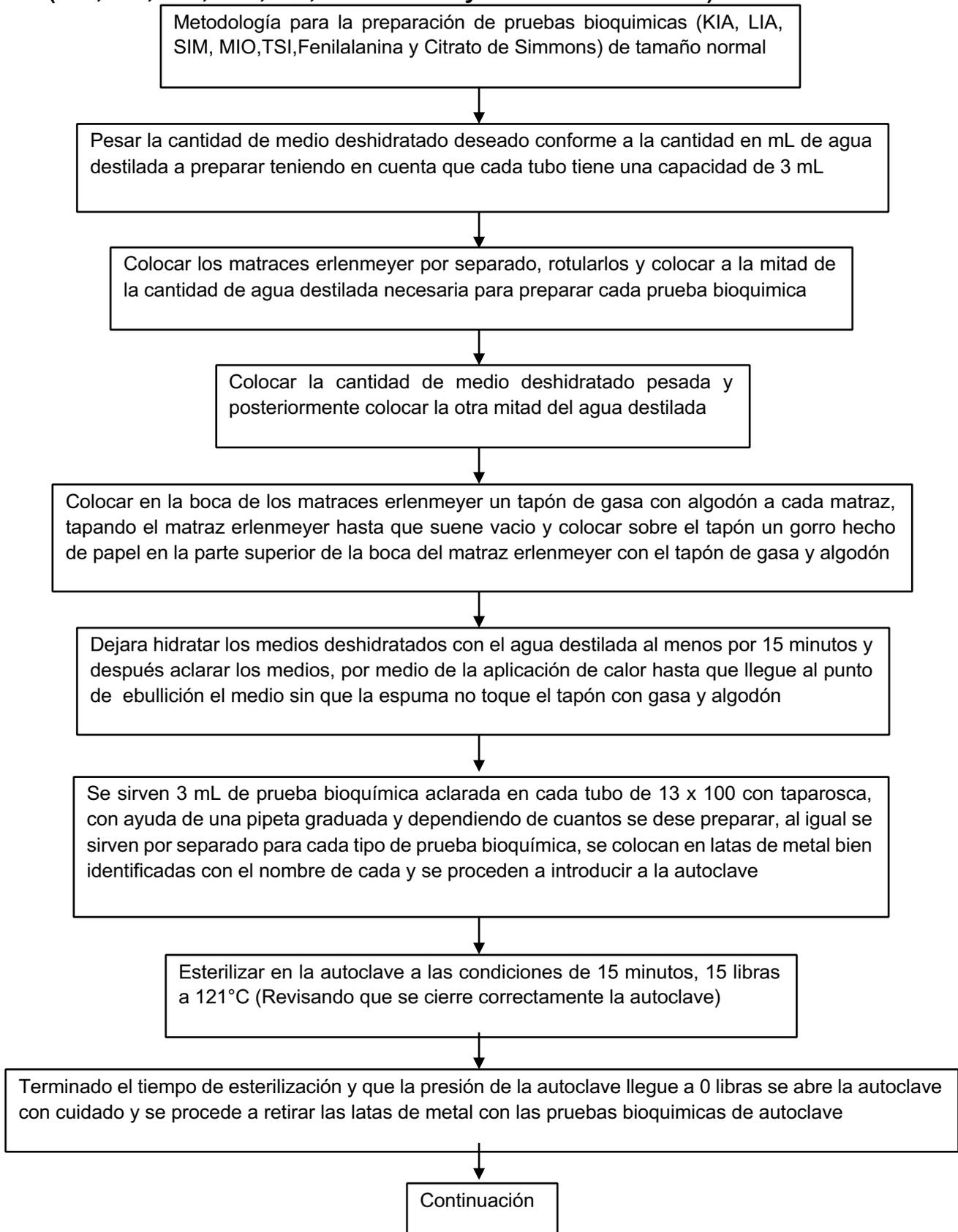
6.9.- Diagrama No.9 Metodología para la preparación de medios de cultivo (Salmonella-Shigella, Sulfito Bismuto, Cetrimida y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato) de tamaño pequeño



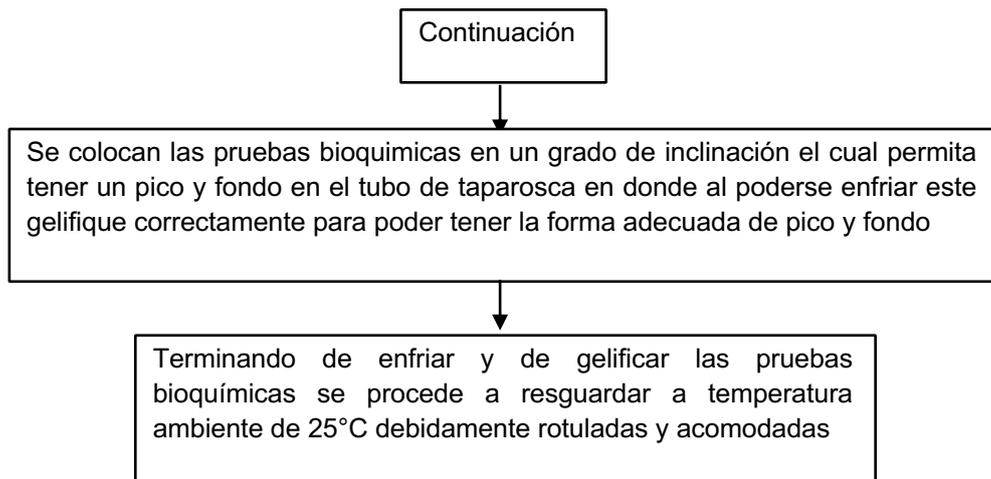
6.9.- Diagrama No.9 Metodología para la preparación de medios de cultivo (Salmonella-Shigella, Sulfito Bismuto, Cetrimida y Agar Xilosa Lisina Desoxicolato) de tamaño pequeño (continuación)



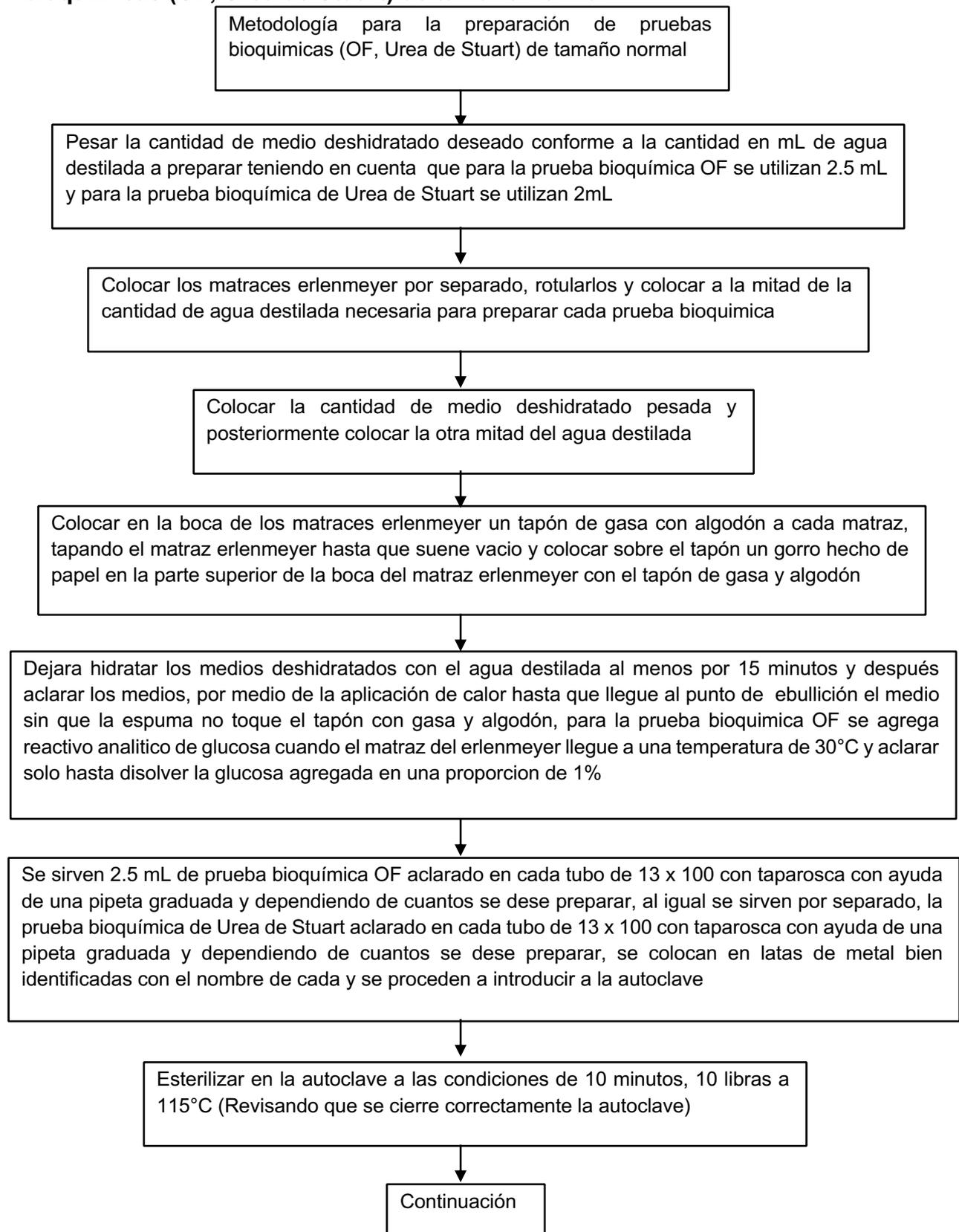
6.10.- Diagrama No.10 Metodología para la preparación de pruebas bioquímicas (KIA, LIA, SIM, MIO, TSI, Fenilalanina y Citrato de Simmons) de tamaño normal.



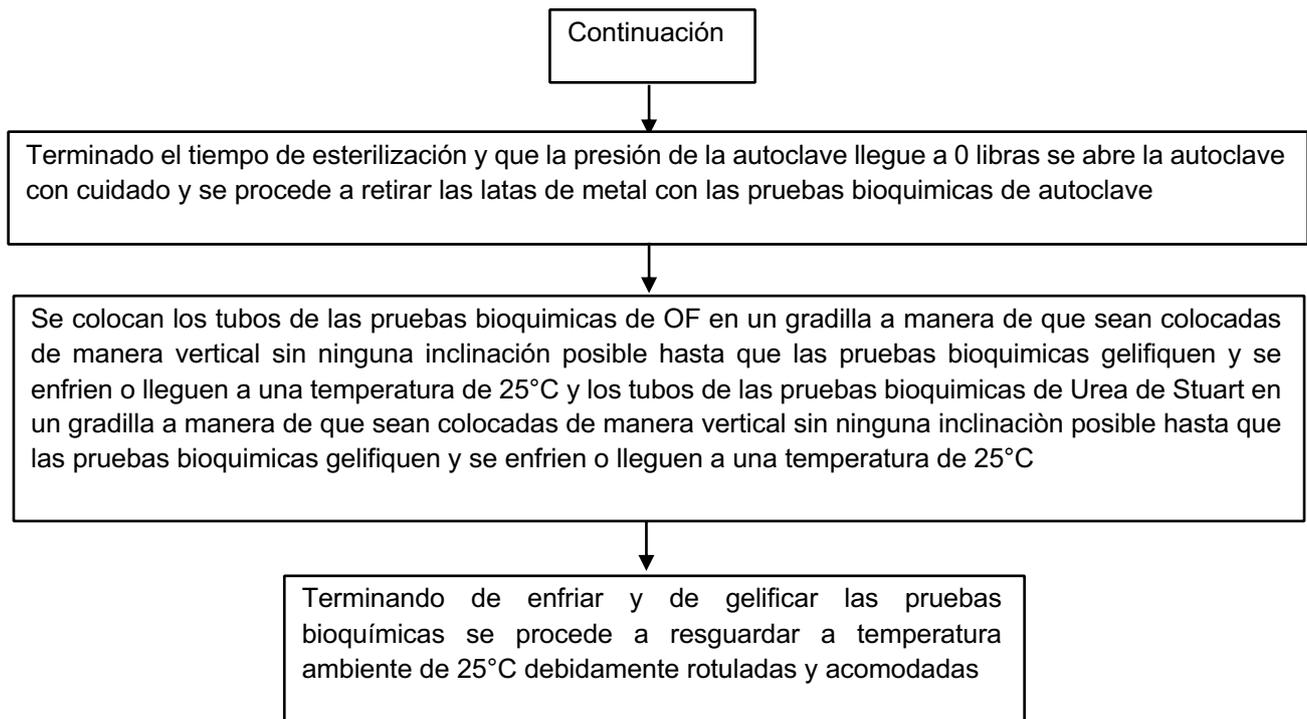
6.10.-Diagrama No.10 Metodología para la preparación de pruebas bioquímicas (KIA, LIA, SIM, MIO, TSI, Fenilalanina y Citrato de Simmons) de tamaño normal



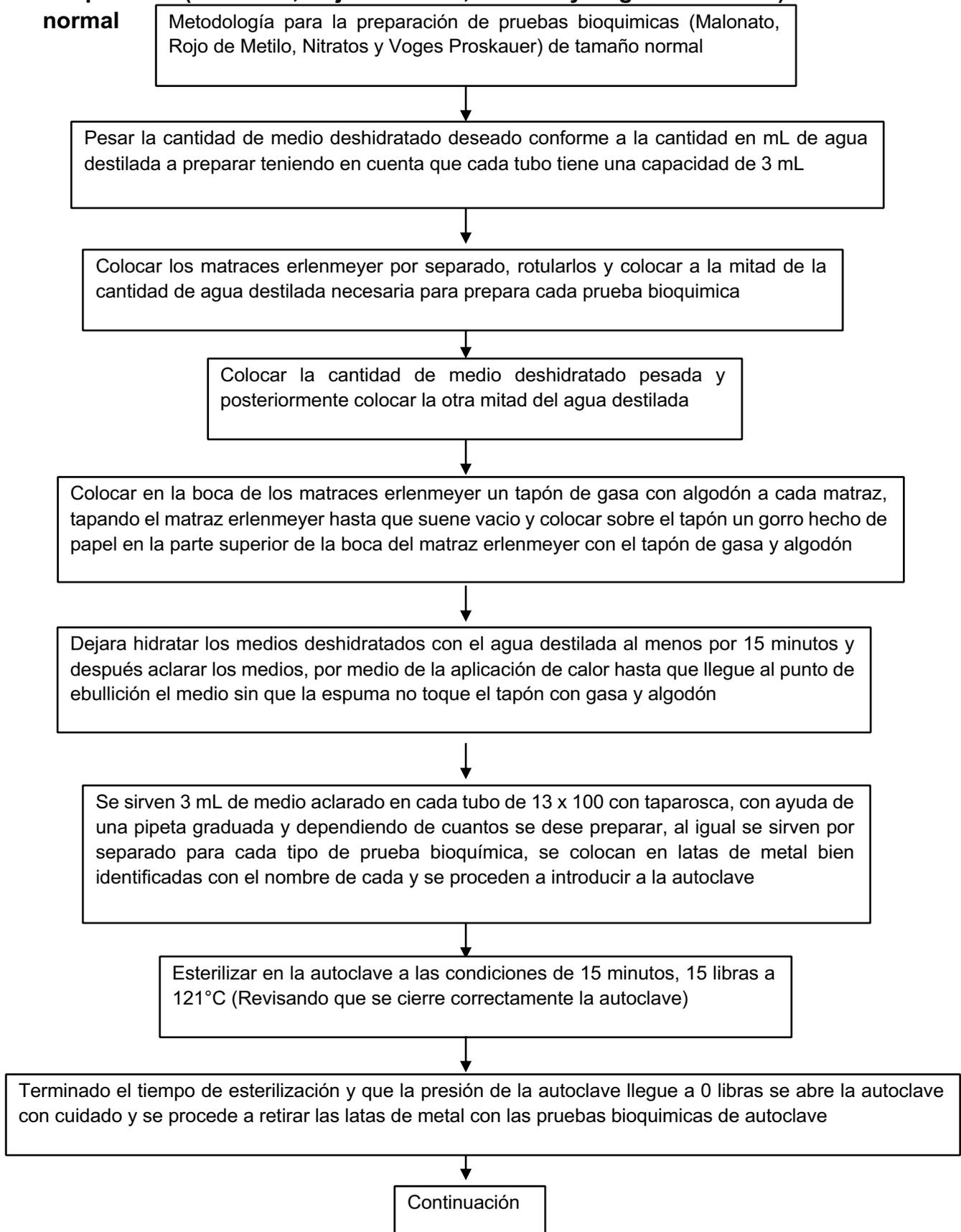
6.11.- Diagrama No.11 Metodología para la preparación de pruebas bioquímicas (OF, Urea de Stuart) de tamaño normal



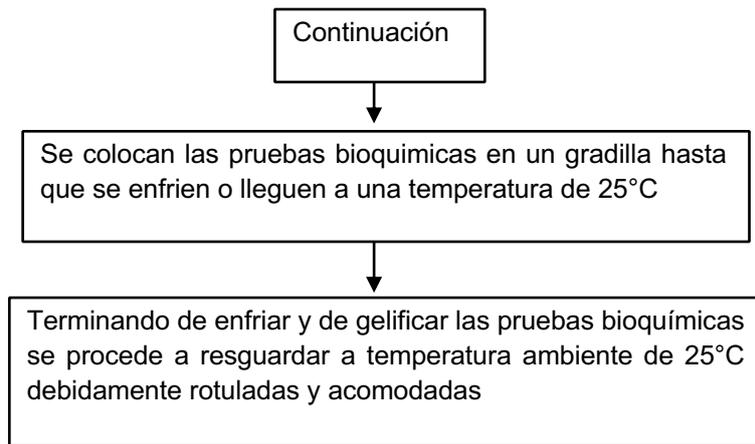
6.11.-Diagrama No.11 Metodología para la preparación de pruebas bioquímicas (OF y Urea de Stuart) de tamaño normal



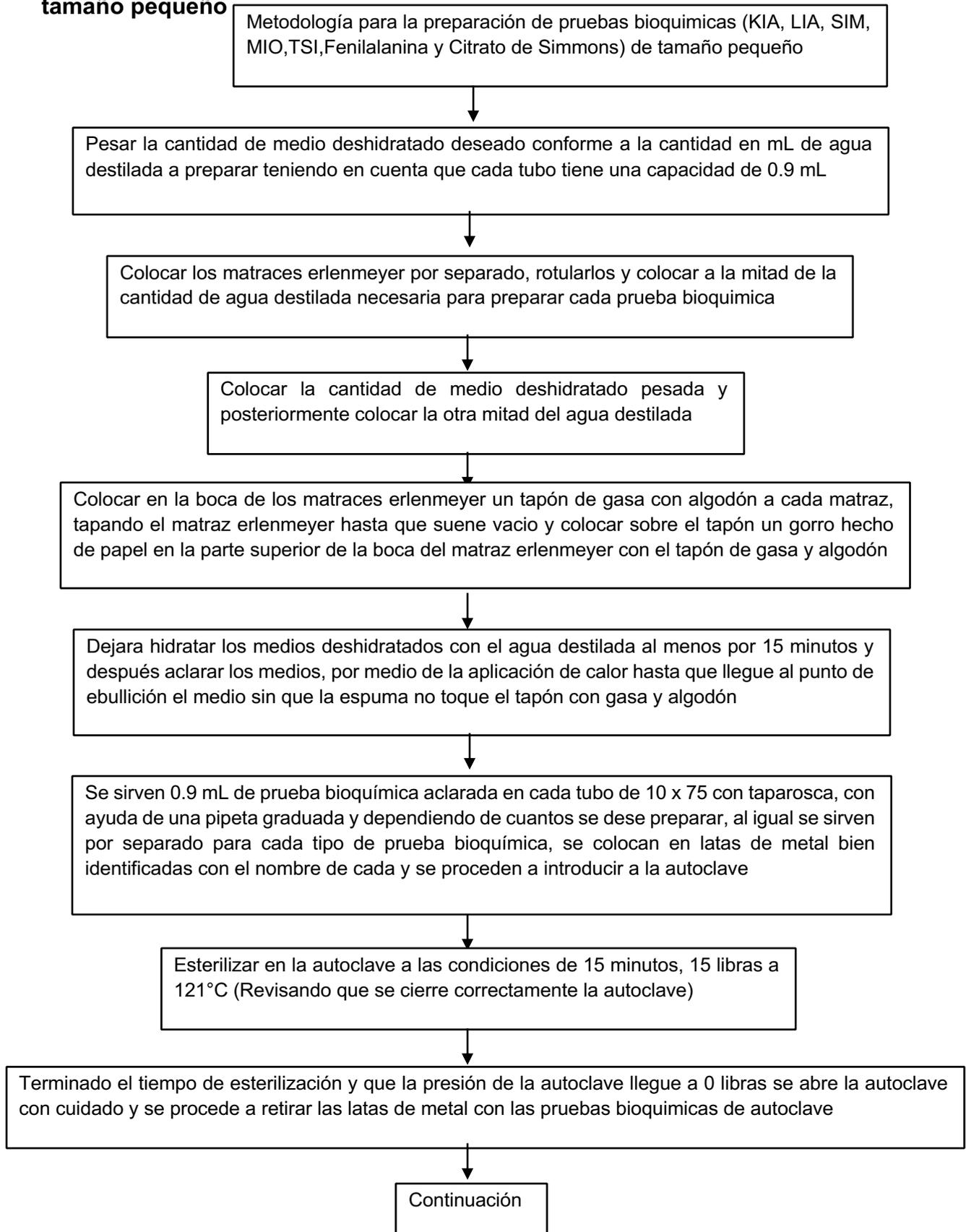
6.12.- Diagrama No.12 Metodología para la preparación de pruebas bioquímicas (Malonato, Rojo de Metilo, Nitratos y Voges Proskauer) de tamaño normal



6.12.- Diagrama No.12 Metodología para la preparación de pruebas bioquímicas (Malonato, Rojo de Metilo, Nitratos y Voges Proskauer) de tamaño normal



6.13.- Diagrama No.13 Metodología para la preparación de pruebas bioquímicas (KIA, LIA, SIM, MIO, TSI, Fenilalanina y Citrato de Simmons) de tamaño pequeño



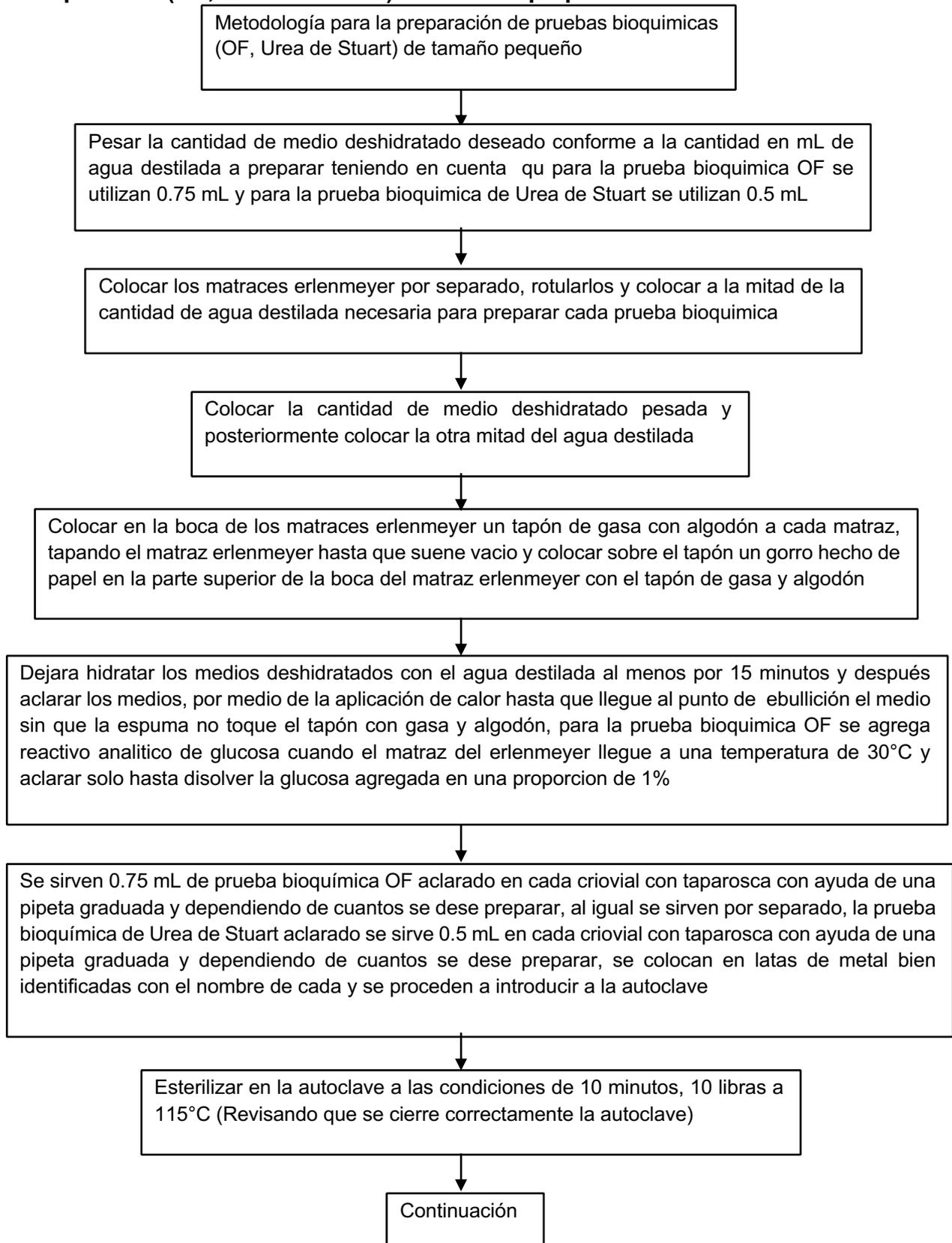
6.13.- Diagrama No.13 Metodología para la preparación de pruebas bioquímicas (KIA, LIA, SIM, MIO, TSI, Fenilalanina y Citrato de Simmons) de tamaño pequeño

Continuación

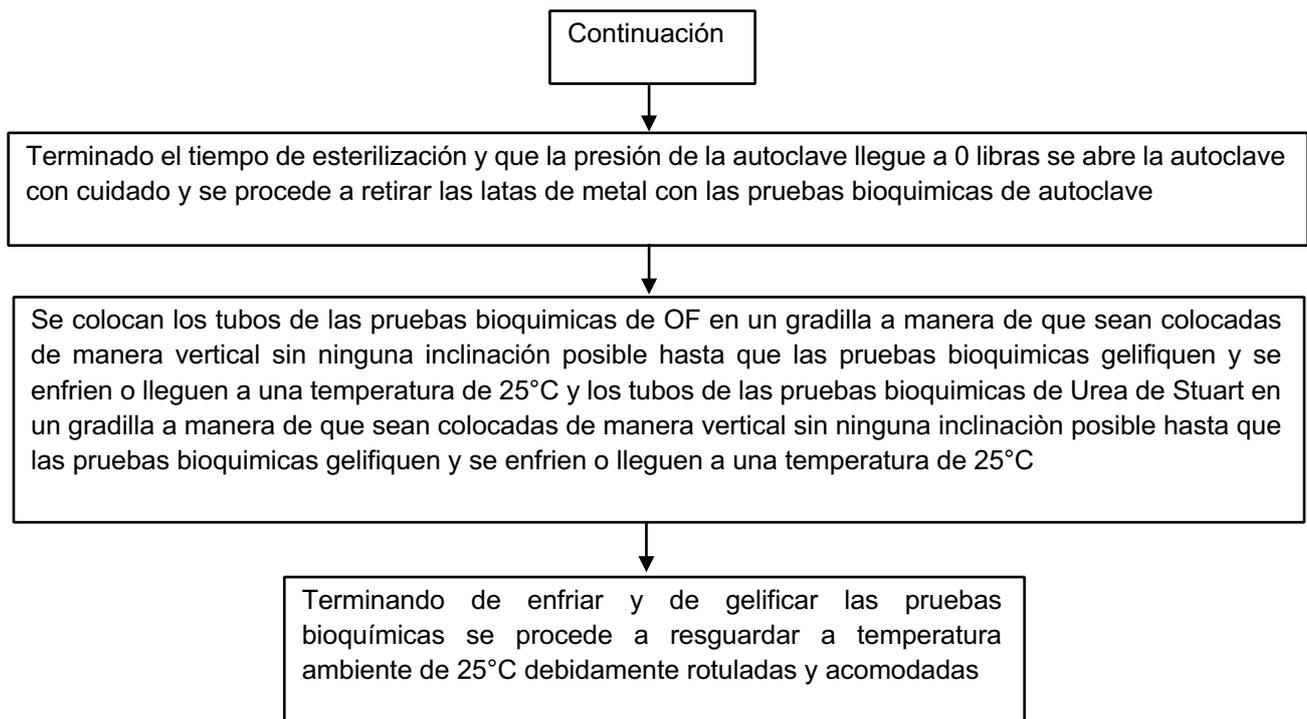
Se colocan las pruebas bioquímicas en un grado de inclinación el cual permita tener un pico y fondo en el tubo de taparosca en donde al poderse enfriar este gelifique correctamente para poder tener la forma adecuada de pico y fondo

Terminando de enfriar y de gelificar las pruebas bioquímicas se procede a resguardar a temperatura ambiente de 25°C debidamente rotuladas y acomodadas

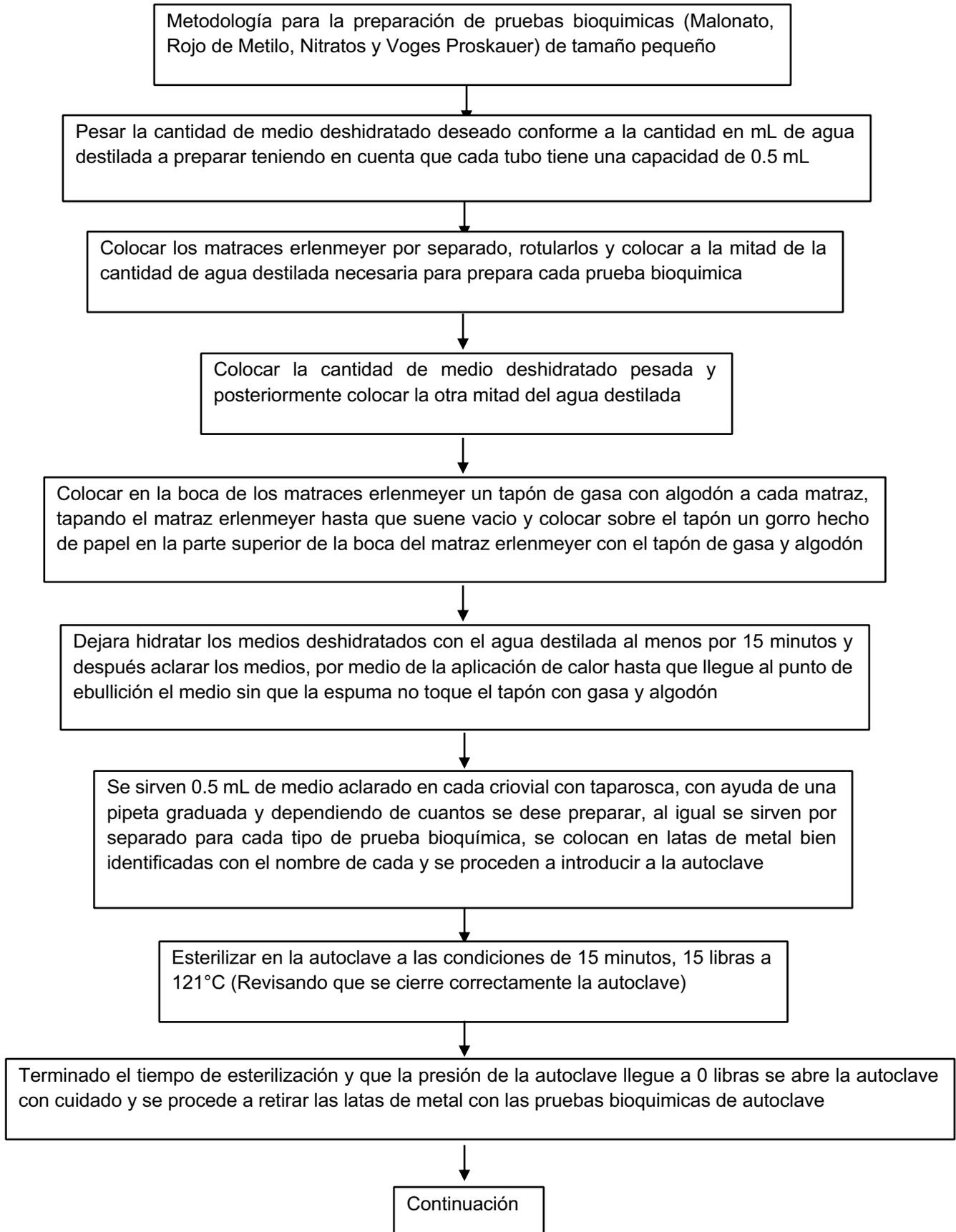
6.14.- Diagrama No.14 Metodología para la preparación de pruebas bioquímicas (OF, Urea de Stuart) de tamaño pequeño



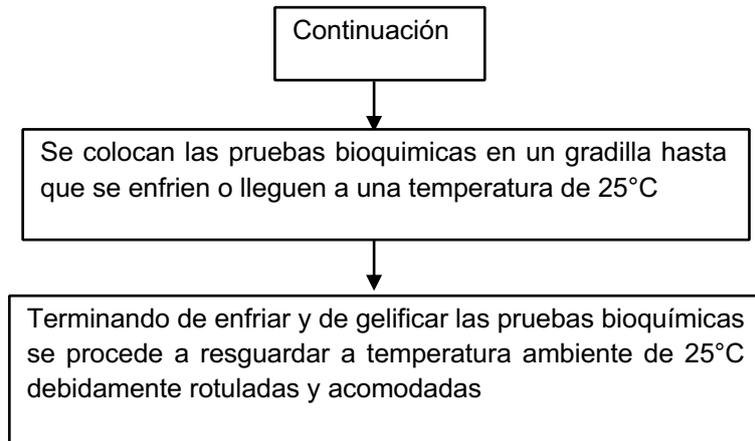
6.14.- Diagrama No.14 Metodología para la preparación de pruebas bioquímicas (OF y Urea de Stuart) de tamaño pequeño



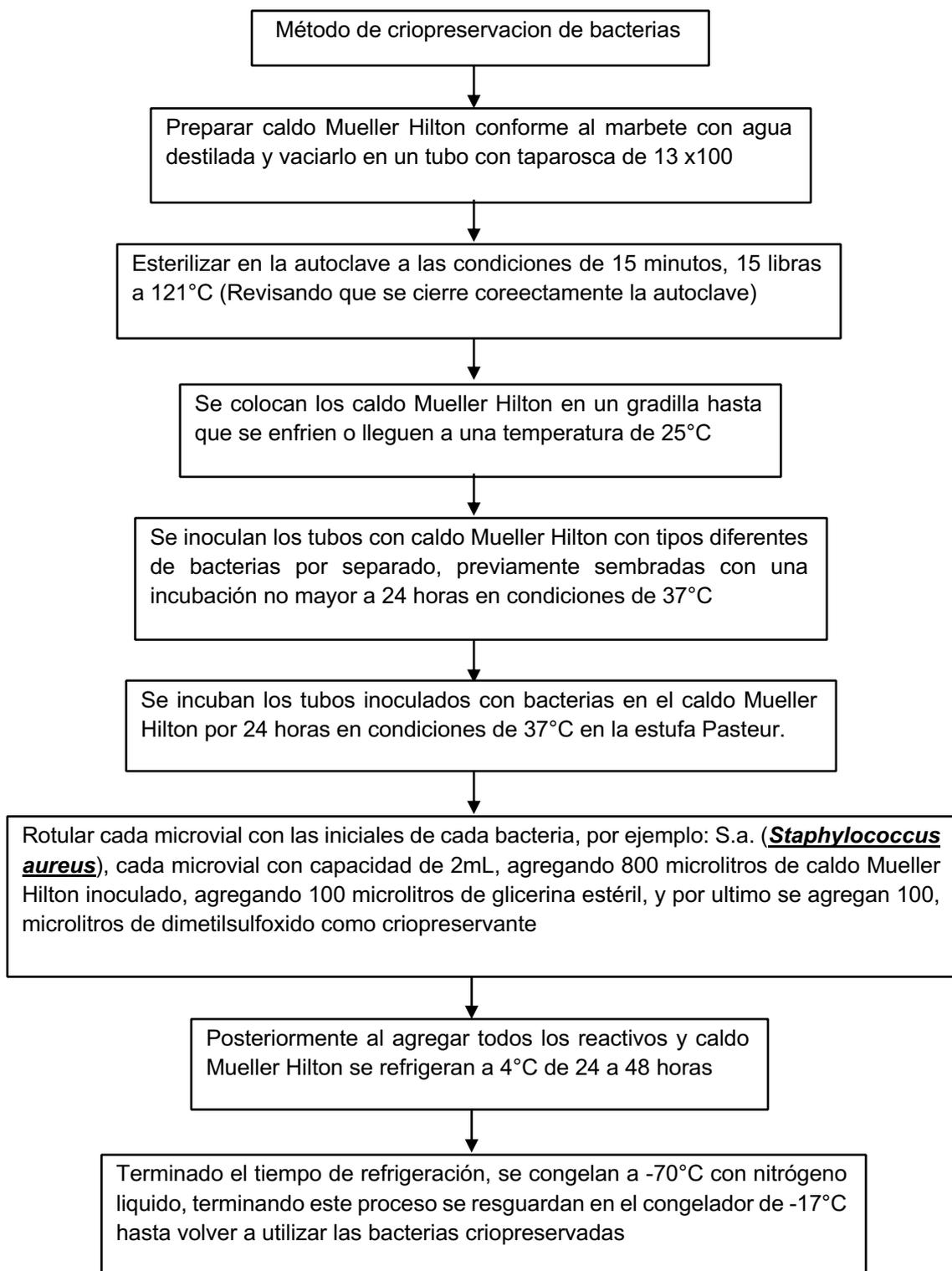
6.15.- Diagrama No.15 Metodología para la preparación de pruebas bioquímicas (Malonato, Rojo de Metilo, Nitratos y Voges Proskauer) de tamaño pequeño.



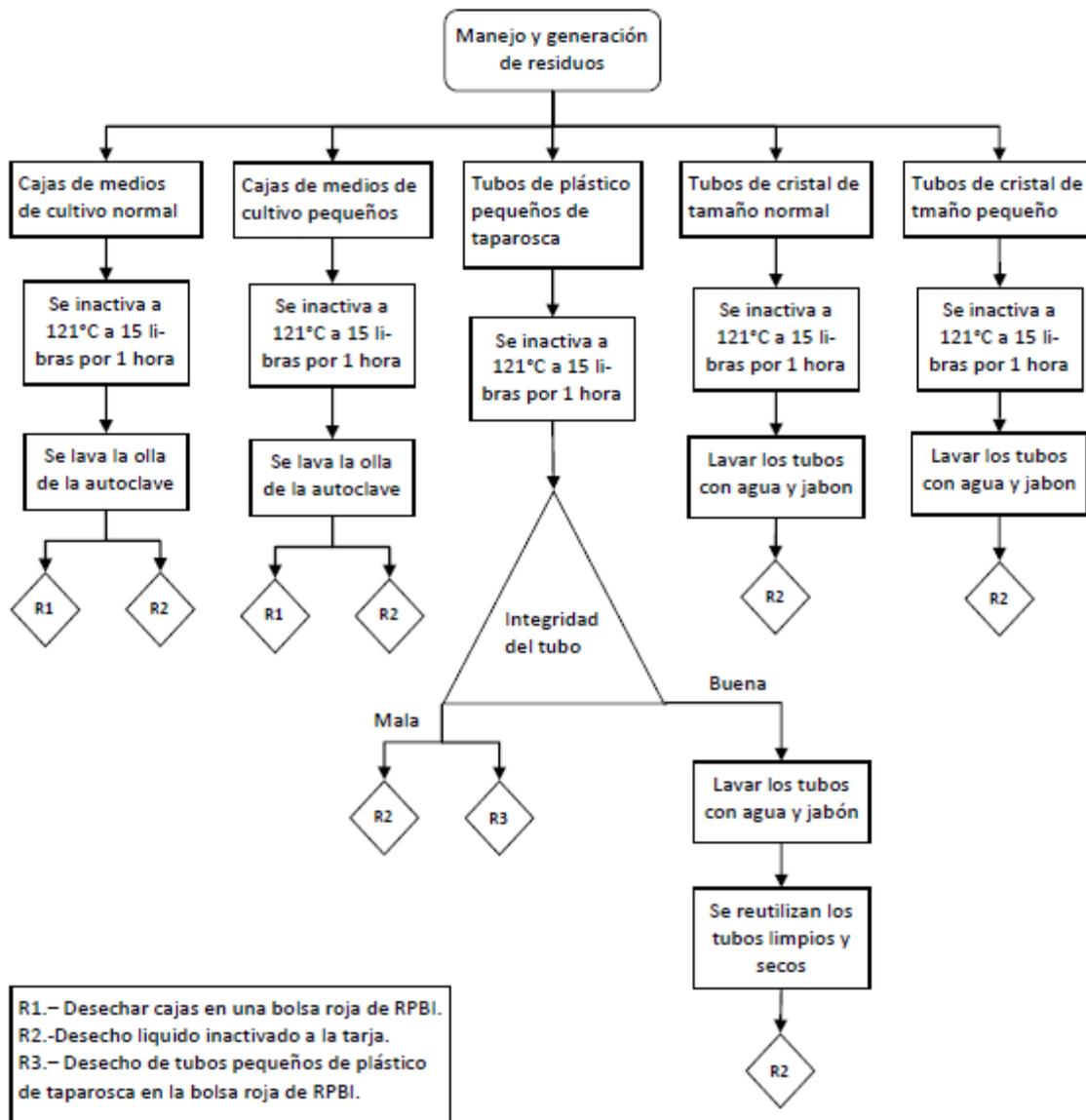
6.15.- Diagrama No.15 Metodología para la preparación de pruebas bioquímicas (Malonato, Rojo de Metilo, Nitratos y Voges Proskauer) de tamaño pequeño



6.16.- Diagrama No. 16 Metodología de criopreservación de bacterias



6.17.- Diagrama No. 17 Manejo y generación de residuos.

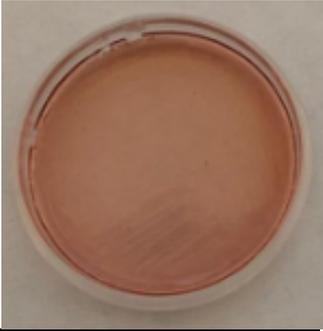
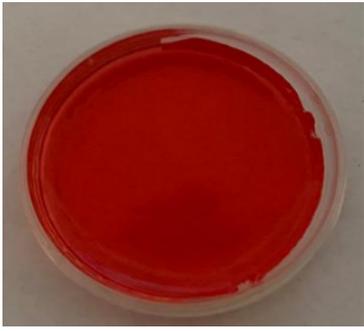
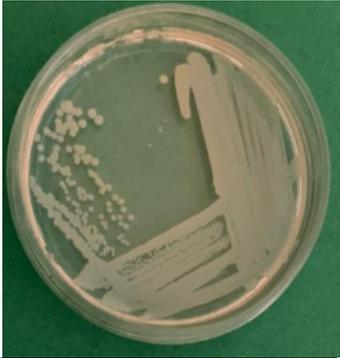


7.- Resultados

7.1.- Resultados de medios de cultivo

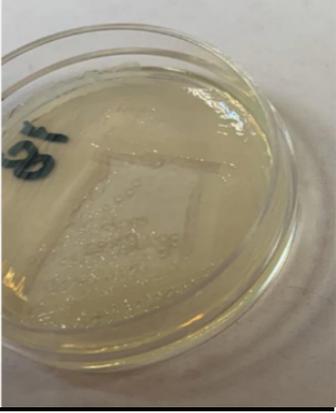
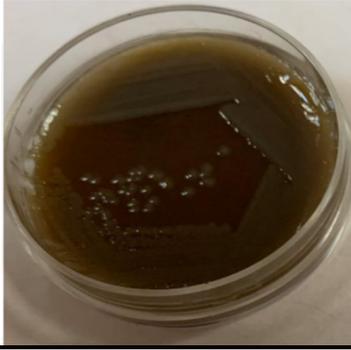
7.1.1.- Staphylococcus aureus.

Tabla No. 4 Resultados de la siembra de Staphylococcus aureus en distintos agares

	
<p>Agar MacConkey</p>	<p>Agar XLD.</p>
	
<p>Agar Mueller Hilton</p>	<p>Agar Sales Manitol,</p>
	
<p>Agar Chocolate</p>	<p>Agar Sangre</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p>Tamaño: Pequeño Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Cambio de color en el medio en el Agar Sales y Manitol e inhibición en algunos medios</p>

7.1.2.- Staphylococcus epidermidis.

Tabla No. 5 Resultados de la siembra de Staphylococcus epidermidis en distintos agares

 <p>Agar Mueller Hinton.</p>	 <p>Agar Sangre.</p>
 <p>Agar Chocolate</p>	
Observaciones Generales de Morfología colonial:	Tamaño: Pequeño Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Color: Blanco Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Sin cambio de color en el medio.

7.1.3.- Streptococcus grupo A

Tabla No. 6 Resultados de la siembra de Streptococcus grupo A en distintos agares

 <p>Agar Chocolate</p>	 <p>Agar Sangre</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p>Tamaño: Pequeño Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Color: Blanco Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Sin cambio de color en el medio con presencia de alfa hemolisis solo en agar Sangre</p>

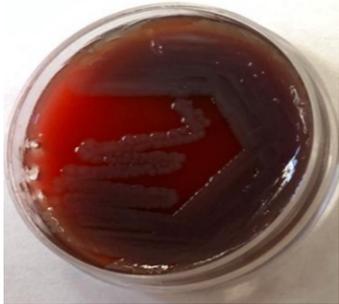
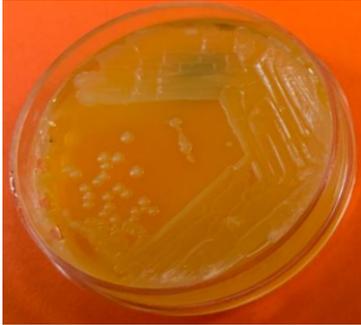
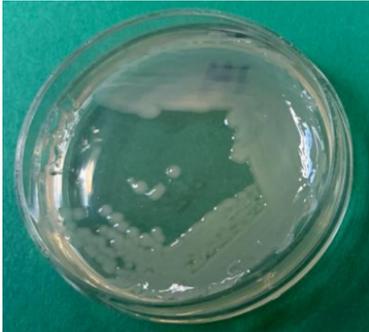
7.1.4.- Streptococcus grupo B

Tabla No. 7 Resultados de la siembra de Streptococcus grupo B en distintos agares

 <p>Agar Chocolate</p>	 <p>Agar Sangre</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p>Tamaño: Pequeño Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Color: Blanco Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Sin cambio de color en el medio con presencia de beta hemolisis solo en agar Sangre</p>

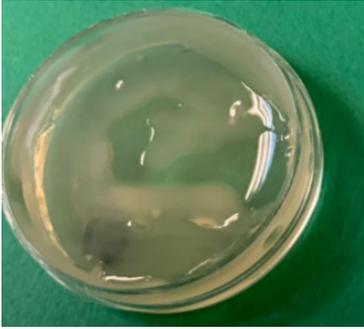
7.1.5.- *Alcaligenes faecalis*

Tabla No. 8 Resultados de la siembra de *Alcaligenes faecalis* en distintos agares

 <p>Agar Sangre</p>	 <p>Agar Chocolate.</p>
 <p>Agar MacConkey.</p>	 <p>Agar XLD.</p>
 <p>Agar Sulfito Bismuto</p>	 <p>Agar Cetrimida</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p>Tamaño: Grande Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Formación de precipitación de FeS en agar Sulfito Bismuto, sin presencia de hemolisis</p>

7.1.6.- *Burkholderia cepacea*

Tabla No. 9 Resultados de la siembra de *Burkholderia cepacea* en distintos agares

 <p>Agar Sangre</p>	 <p>Agar Chocolate.</p>
 <p>Agar MacConkey.</p>	 <p>Agar Verde Brillante</p>
 <p>Agar Cetrimida</p>	 <p>Agar XLD</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p>Tamaño: Grande Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Mucoide. Otras Propiedades: Sin cambio de color en los medios, presencia de olor a tortilla</p>

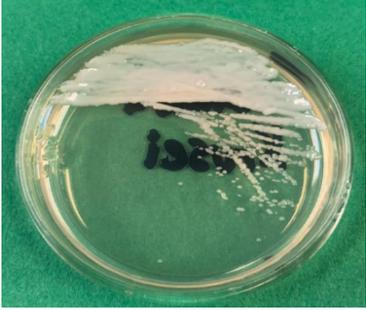
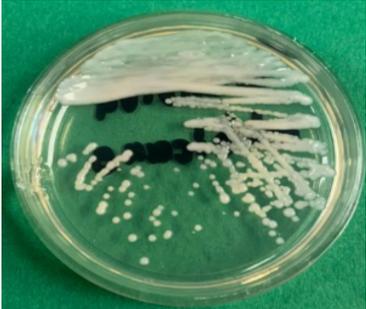
7.1.7.- Citrobacter koseri

Tabla No. 10 Resultados de la siembra de Citrobacter koseri en distintos agares

 <p>Agar Sangre</p>	 <p>Agar Chocolate.</p>
 <p>Agar MacConkey.</p>	 <p>Agar Salmonella-Shigella</p>
 <p>Agar Verde Brillante</p>	 <p>Agar XLD</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p>Tamaño: Grande Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Sin cambios en los medios.</p>

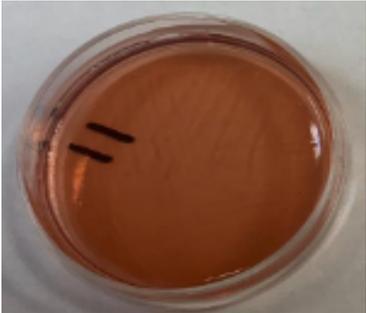
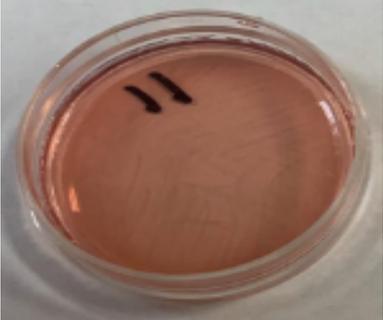
7.1.8.- Cándida

Tabla No. 11 Resultados de la siembra de distintas especies de Cándida en agar SDA (Sabouraud Dextrosa Agar)

 <p style="text-align: center;"><u><i>Candida krusei</i></u></p>	 <p style="text-align: center;"><u><i>Candida tropicalis</i></u></p>
 <p style="text-align: center;"><u><i>Candida albicans</i></u></p>	 <p style="text-align: center;"><u><i>Candida parapsilosis</i></u></p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p>Tamaño: Pequeño a excepción de del tamaño mediano de <u><i>Candida albicans</i></u> Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Color: Blanca Propiedad óptica: Opaca Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Sin cambios en los medios, con presencia de olor a pan.</p>

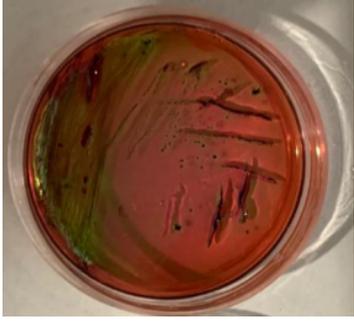
7.1.9.- *Enterococcus faecalis*

Tabla No. 12 Resultados de la siembra de *Enterococcus faecalis* en distintos agares

 <p>Agar Sangre</p>	 <p>Agar Mueller Hilton</p>
 <p>Agar MacConkey.</p>	 <p>Agar Chocolate</p>
 <p>Agar Salmonella-Shigella</p>	 <p>Agar XLD</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p>Tamaño: Pequeño Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Presenta inhibición de crecimiento en los agares McConkey, salmonella-Shigella y XLD</p>

7.1.10.- *Escherichia coli*

Tabla No. 13 Resultados de la siembra de *Escherichia coli* en distintos agares

 <p>Agar Sangre</p>	 <p>Agar EMB</p>
 <p>Agar MacConkey.</p>	 <p>Agar Chocolate</p>
 <p>Agar Verde Brillante</p>	 <p>Agar XLD</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p>Tamaño: Grande Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Cambios e color en los medios diferentes</p>

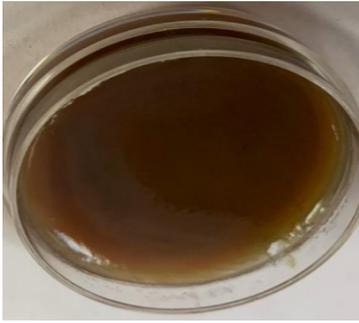
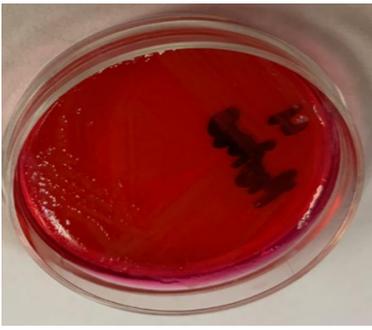
7.1.11.- Morganella morganii

Tabla No. 14 Resultados de la siembra de Morganella morganii en distintos agares

 <p>Agar Sangre</p>	 <p>Agar Chocolate</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p>Tamaño: Grande Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: In cambio de coloración en los medios y en el agar Sangre existe presencia de alfa-hemolisis</p>

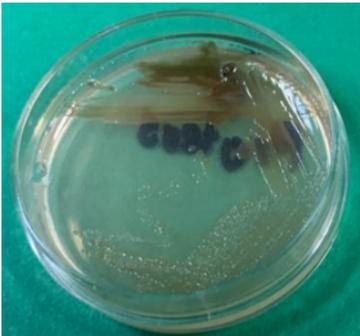
7.1.12.- Proteus mirabilis

Tabla No. 15 Resultados de la siembra de Proteus mirabilis en distintos agares

 <p style="text-align: center;">Agar Sangre</p>	 <p style="text-align: center;">Agar Chocolate</p>
 <p style="text-align: center;">Agar MacConkey.</p>	 <p style="text-align: center;">Agar Salmonella Shigella</p>
 <p style="text-align: center;">Agar Verde Brillante</p>	 <p style="text-align: center;">Agar Sulfito Bismuto</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial para Agares Sangre, MacConkey y Chocolate:</p> <p>Tamaño: Sin tamaño Borde: Sin borde. Forma: Sin forma. Elevación: Sin elevación. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Sin cambio de color en los medios, pero presencia de efecto de swarming</p>	<p>Observaciones Generales de Morfología colonial para Agares Salmonella-Shigella, Verde Brillante y Sulfito Bismuto:</p> <p>Tamaño: Pequeña Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Sin cambio de color en el medio</p>

7.1.13.- *Proteus vulgaris*

Tabla No. 16 Resultados de la siembra de *Proteus vulgaris* en distintos agares

 <p style="text-align: center;">Agar Sangre</p>	 <p style="text-align: center;">Agar Chocolate</p>
 <p style="text-align: center;">Agar MacConkey.</p>	 <p style="text-align: center;">Agar Salmonella Shigella</p>
 <p style="text-align: center;">Agar Verde Brillante</p>	 <p style="text-align: center;">Agar Sulfito Bismuto</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial para Agares Sangre y MacConkey:</p> <p>Tamaño: Sin tamaño Borde: Sin borde. Forma: Sin forma. Elevación: Sin elevación. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Sin cambio de color en los medios, pero presencia de efecto de swarming</p>	<p>Observaciones Generales de Morfología colonial para Agares Chocolate Salmonella-Shigella, Verde Brillante y Sulfito Bismuto:</p> <p>Tamaño: Pequeña Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Sin cambio de color en el medio, solo efecto de swarming para agar Chocolate</p>

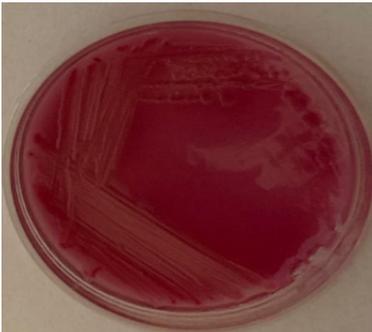
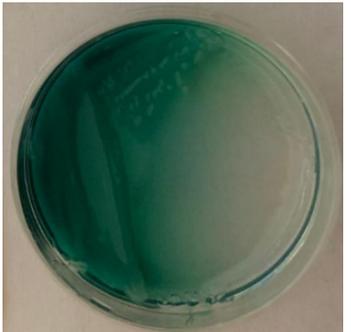
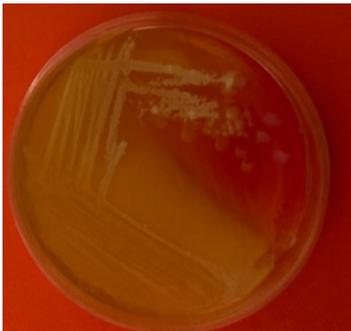
7.1.14.- Providencia stuartii

Tabla No. 17 Resultados de la siembra de Providencia stuartii en distintos agares

 <p>Agar Sangre</p>	 <p>Agar Chocolate.</p>
 <p>Agar MacConkey.</p>	 <p>Agar Salmonella-Shigella</p>
 <p>Agar Mueller Hilton</p>	 <p>Agar XLD</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p>Tamaño: Mediano Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Sin cambios en los medios e inhibición en los agares MacConkey, Salmonella-Shigella, Mueller Hilton y XLD</p>

7.1.15.- *Pseudomonas aeruginosa*

Tabla No. 18 Resultados de la siembra de *Pseudomonas aeruginosa* en distintos agares

 <p data-bbox="397 692 568 725">Agar Sangre</p>	 <p data-bbox="979 692 1193 725">Agar Chocolate.</p>
 <p data-bbox="363 1088 600 1122">Agar MacConkey.</p>	 <p data-bbox="986 1088 1187 1122">Agar Ceftrimida</p>
 <p data-bbox="347 1487 619 1520">Agar Sulfito Bismuto</p>	 <p data-bbox="1018 1520 1155 1554">Agar XLD</p>
<p data-bbox="193 1749 775 1823">Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p data-bbox="807 1585 1369 1984"> Tamaño: Grande Borde: Irregular. Forma: Circular se expande. Elevación: Plana. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Cambio de coloración en los medios, presencia de olor a tortilla y presencia de pigmento azul verdoso en el agar Ceftrimida </p>

7.1.16.- *Pseudomonas putida*

Tabla No. 19 Resultados de la siembra de *Pseudomonas putida* en distintos agares

 <p>Agar Sangre</p>	 <p>Agar Chocolate.</p>
 <p>Agar MacConkey.</p>	 <p>Agar Cetrimida</p>
 <p>Agar Salmonella-Shigella</p>	 <p>Agar XLD</p>
<p>Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p>Tamaño: Grande Borde: Irregular. Forma: Circular. Elevación: Plana. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Cambio de coloración en los medios, presencia de olor a tortilla.</p>

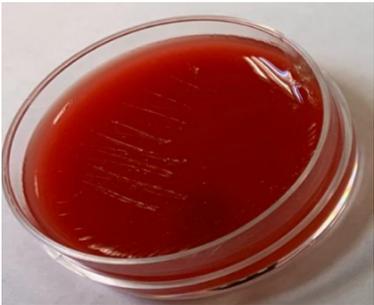
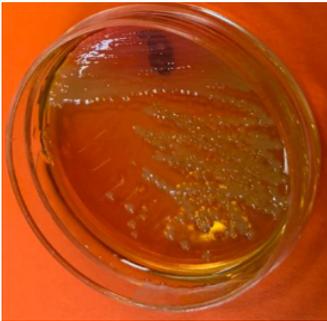
7.1.17.- Salmonella typhi

Tabla No. 20 Resultados de la siembra de Salmonella typhi en distintos agares

 <p data-bbox="397 638 568 674">Agar Sangre</p>	 <p data-bbox="979 638 1193 674">Agar Chocolate.</p>
 <p data-bbox="349 1037 617 1072">Agar Verde Brillante</p>	 <p data-bbox="959 1037 1214 1072">Agar Mueller Hilton</p>
 <p data-bbox="316 1435 651 1471">Agar Salmonella-Shigella</p>	 <p data-bbox="1019 1435 1153 1471">Agar XLD</p>
<p data-bbox="193 1666 775 1736">Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p data-bbox="807 1503 1369 1899"> Tamaño: Grande Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Cambio de coloración en los medios, presencia de precipitado de FeS en los agares Salmonella-Shigella y XLD </p>

Serratia marcescens

Tabla No. 21 Resultados de la siembra de **Serratia marcescens** en distintos agares

 <p data-bbox="397 689 568 723">Agar Sangre</p>	 <p data-bbox="954 689 1222 723">Agar Verde Brillante</p>
 <p data-bbox="416 1088 549 1122">Agar XLD</p>	 <p data-bbox="959 1088 1214 1122">Agar Mueller Hilton</p>
<p data-bbox="193 1285 775 1352">Observaciones Generales de Morfología colonial:</p>	<p data-bbox="815 1151 1366 1485">Tamaño: Grande Borde: Entero. Forma: Circular. Elevación: Convexa. Aspecto: Húmedo Superficie: Lisa Propiedad óptica: Opaca y brillante. Consistencia: Suave. Otras Propiedades: Cambio de coloración en los medios.</p>

7.2.-Resultados de pruebas bioquímicas primarias y secundarias

Tabla No. 22 Resultados de pruebas bioquímicas primarias para cierto grupo de bacterias

Género/Especie	Gram	Catalasa	Oxidasa	O/F
<i>K. pneumoniae</i>	Bacilos gram negativos	+	-	Anaerobio facultativo
<i>S. marcescens</i>	Bacilos gram negativos	+	-	Anaerobio facultativo
<i>M. morganii</i>	Bacilos gram negativos	+	+	Anaerobio facultativo
<i>E. coli</i>	Bacilos gram negativos	+	-	Anaerobio facultativo
<i>P. aeruginosa</i>	Bacilos gram negativos	+	+	Aerobio estricto
<i>E. faecalis</i>	Cocos gram positivos	-	-	Anaerobio facultativo
<i>P. mirabilis</i>	Bacilos gram negativos	+	-	Anaerobio facultativo
<i>P. vulgaris</i>	Bacilos gram negativos	+	-	Anaerobio facultativo

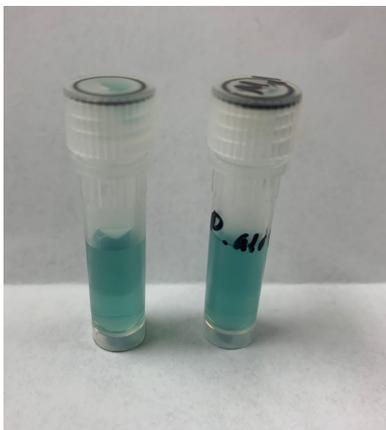


Imagen 9. Malonatos (+/-)

El caldo malonato es un medio que contiene una alta concentración de malonato de sodio, extracto de levadura y una cantidad mínima de glucosa para promover el crecimiento de organismos.

Utiliza colorante azul de bromotimol, que es verde en medios no inoculados (Imagen 9). Si un organismo no puede utilizar malonato pero logra fermentar a la glucosa, puede tornar el medio ligeramente amarillo o no producir cambio en la coloración.

Si el organismo utiliza malonato, alcalinizará el medio y cambiará el indicador de verde a azul intenso.



Imagen 10. LIA (-/+)

La prueba de lisina descarboxilasa es útil para diferenciar las especies de *Citrobacter lactosa* negativas (0% positivas) de las especies de *Salmonella* (98% positivas). Donde la enzima descarboxilasa retira una molécula de CO₂ de un aminoácido para formar aminas de reacción alcalina:

Lisina: Cadaverina

Ornitina: Putrescina

Arginina: Citrulina.

Un cambio de color amarillo en el indicador violeta de bromocresol en el tubo muestra la acidificación (Imagen 10).

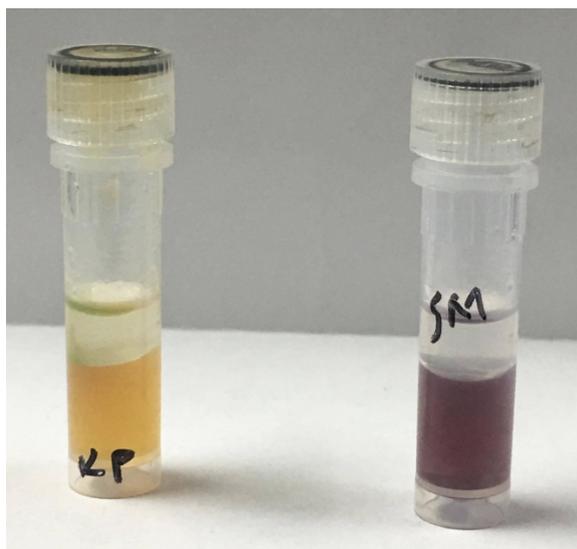


Imagen 11. Resultado (-/+) Prueba MIO.

Medio utilizado en la identificación de miembros de la familia Enterobacteriaceae con base a la movilidad, producción de indol y actividad enzimática ornitina descarboxilasa, utilizando púrpura de bromocresol como indicador de pH.

Los microorganismos fermentadores de glucosa acidifican el medio de cultivo y producen viraje de color púrpura al amarillo (Imagen 11). Las condiciones de acidez son favorables para la actividad enzimática ornitina descarboxilasa, que actúa sobre la ornitina generando putrescina, con la consecuente alcalinización del medio de cultivo y viraje a color púrpura.

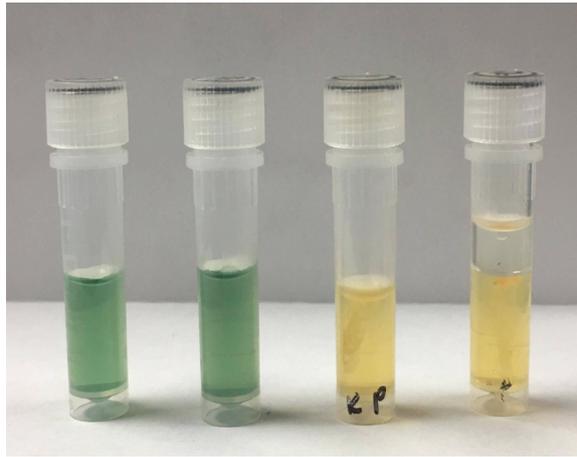


Imagen 12. Resultado (+/-) Prueba OF

Es una prueba que indica el tipo de metabolismo energético: Respiratorio (O) o Fermentador (F), utilizando glucosa como sustrato. Permite detectar la acumulación de ácidos con un indicador ácido-base llamado azul de bromotimol.

Los organismos aerobios crecen en la superficie del medio del tubo abierto, transformando la glucosa en CO_2 , la superficie del medio se verá ligeramente amarilla por la formación de ácido carbónico generado al reaccionar el CO_2 con el agua del medio. En el tubo cerrado el cultivo se mantiene azul-verdoso.

Las bacterias fermentadoras producen ácidos a partir de la glucosa, viran el cultivo del tubo cerrado a amarillo; en el tubo abierto se inicia viraje en el fondo, al transcurrir 24 horas se puede difundir por todo el medio virándolo a amarillo (Imagen 12).

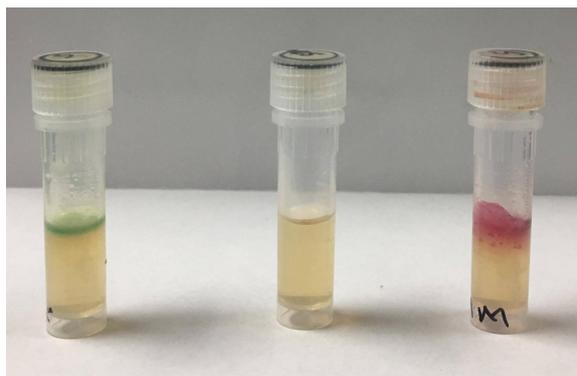
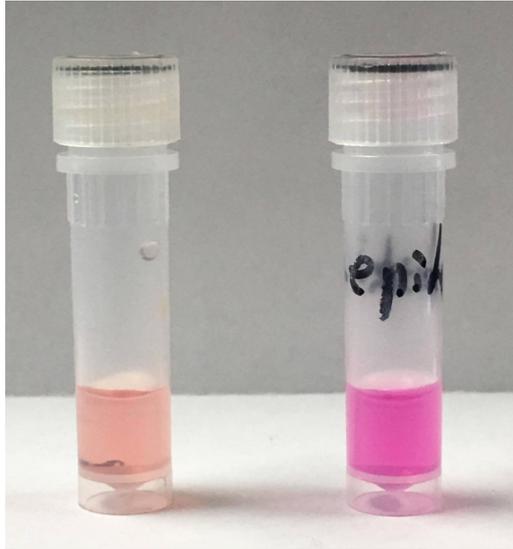


Imagen 13. Resultado (+/-) Prueba SIM.

Los elementos del medio SIM posibilitan la determinación de tres actividades por las que se pueden diferenciar las bacterias entéricas. El tiosulfato sódico y el sulfato ferroso de amonio son indicadores de producción de ácido sulfhídrico. El sulfato ferroso de amonio reacciona con gas H_2S para producir sulfuro ferroso, un precipitado negro.

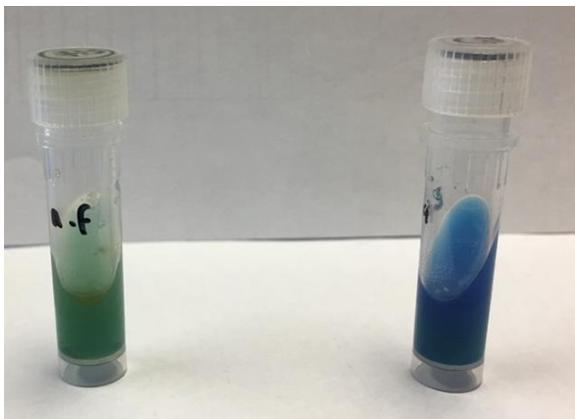
La peptona de caseína es rica en triptófano, que determinados microorganismos atacan, lo que da como resultado la producción de indol.

La detección de motilidad es posible gracias a la naturaleza semisólida del medio, (Imagen 13).



Las bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa, liberan amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio de cultivo haciendo virar el indicador rojo de fenol del color amarillo al rojo purpura (Imagen 14).

Imagen 14. Resultado (+/-) Prueba Urea.



La prueba positiva se representa por la producción de color azul oscuro en el término de 24 a 48 horas, que indica la utilización de citrato con formación de productos alcalinos. (Imagen 15). La prueba también puede considerarse positiva sin que haya color azul, si hay desarrollo visible en la estria de siembra

Imagen 15. Resultado (+/-) Prueba Citrato de Simmons.

Tabla No.23 Resultados de pruebas bioquímicas secundarias para ciertas bacterias.

Especie	S	I	M	KIA	TSI	LIA	MR	V p	Citrat os	Urea	Malonatos	Nitratos	Fenil ·A	M	I	O
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	A/A H2S (-) Gas (+)	A/A H2S (-) Gas (+)	L (+)	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	-	-	+	A/A	A/A	L (+)	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>M. morganii</i>	-	+	+	Al/A H2S (-) Gas (+)	A/A H2S (-) Gas (+)	L (+)	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	+	+	A/A H2S (-) Gas (+)	A/A H2S (-) Gas (+)	L (+)	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	-	+	Al/Al H2S (-) Gas (-)	Al/Al H2S (-) Gas (-)	L (+)	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>P. mirabilis</i>	+	-	+	Al/A H2S (+) Gas (-)	Al/A H2S (+) Gas (-)	L (-)	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>P. vulgaris</i>	+	+	+	Al /A H2S (+) Gas (-)	A/A H2S (+) Gas (-)	L (-)	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>S. typhimurium</i>	+	-	+	Al/A H2S (+) Gas (-)	Al/A H2S (+) Gas (-)	L(-)	+	-	+	-	-	V	-	+	-	+
<i>A. faecalis</i>	-	-	-	Al/A	A/A	L(+)	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>C. Koseri</i>	-	+	+	Al/A	A/A	L(-)	+	-	+	-	+	V	-	+	+	+
<i>P. stuartii</i>	-	+	+	Al/A	A/A	L(-)	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>E. aerogenes</i>	-	-	+	A/A	A/A	L(+)	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>P. putida</i>	-	-	-	Al/Al	Al/A	L(+)	-	-	+	-	+	V	-	-	-	+
<i>B. cepacea</i>	-	-	-	Al/A	A/A	L(+)	-	-	+	-	-	V	-	-	-	+

7.3.- Resultados del proceso de Criopreservación.

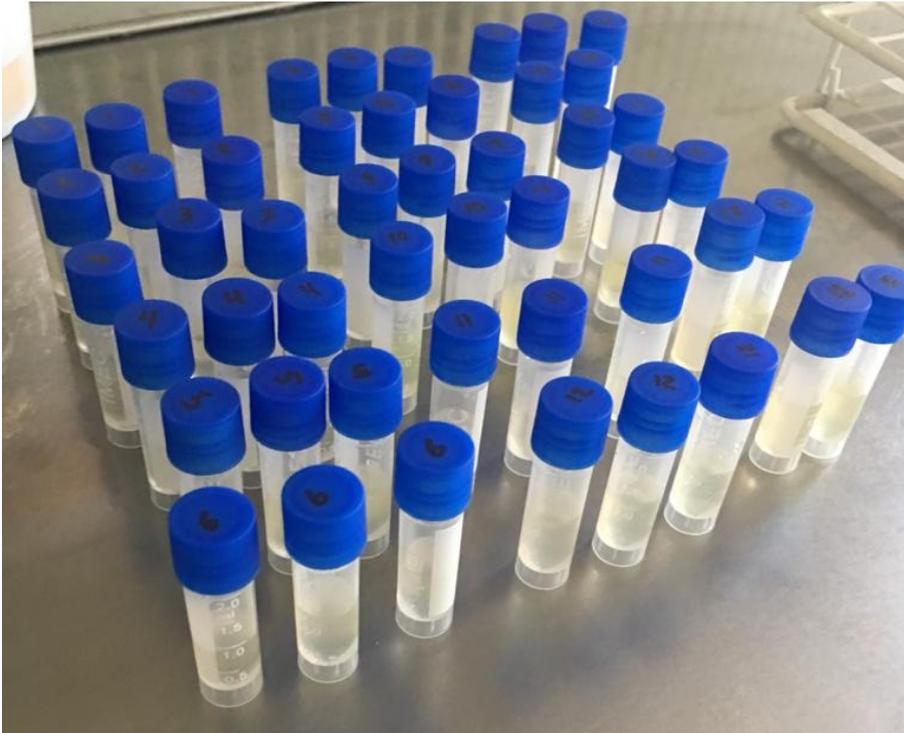


Imagen 16. Cepas Criopreservadas

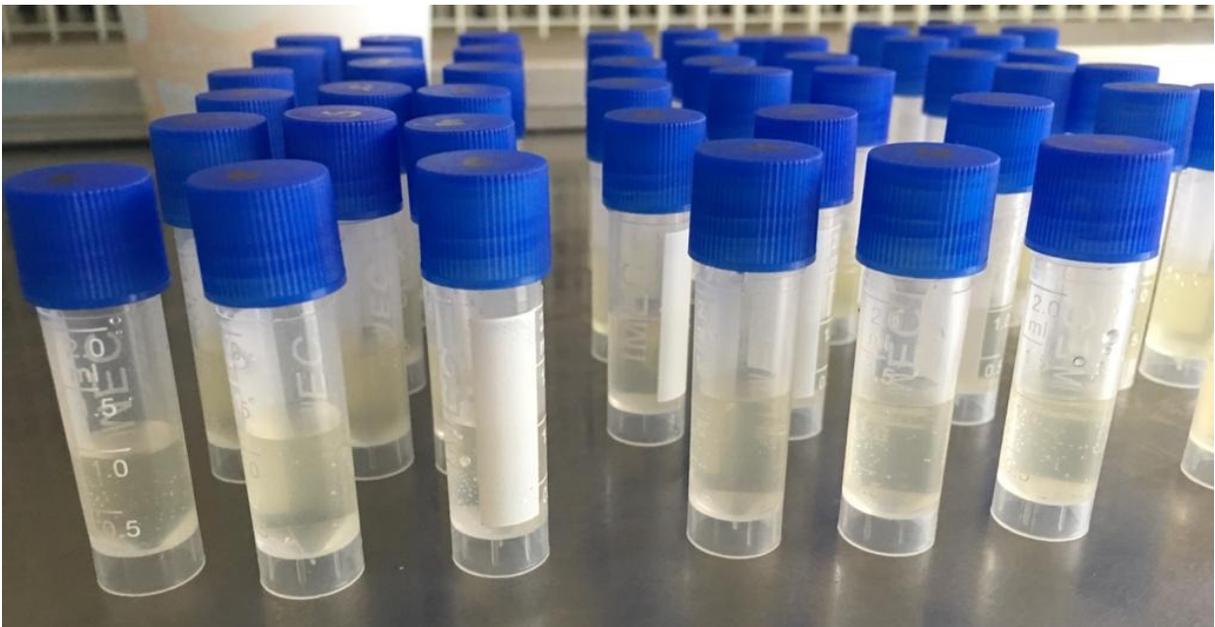


Imagen 17. Establecimiento de número único de identificación.

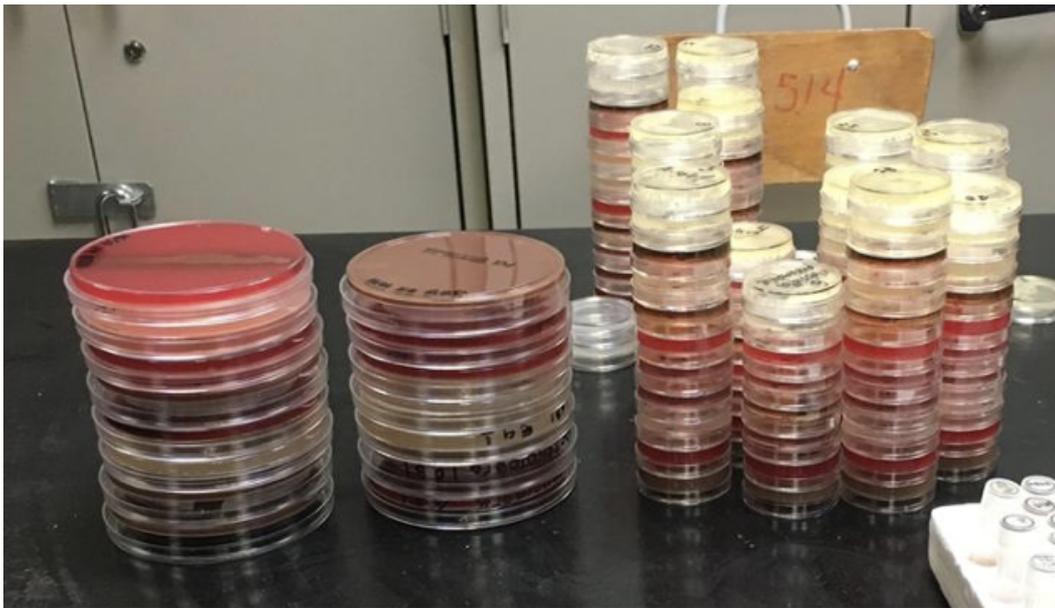


Imagen 18. Comparación de medios de cultivo de tamaño normal con un volumen aproximado de ± 20 mL. y de tamaño pequeño con un volumen aproximado de ± 5 mL. (Viéndose de izquierda a derecha)

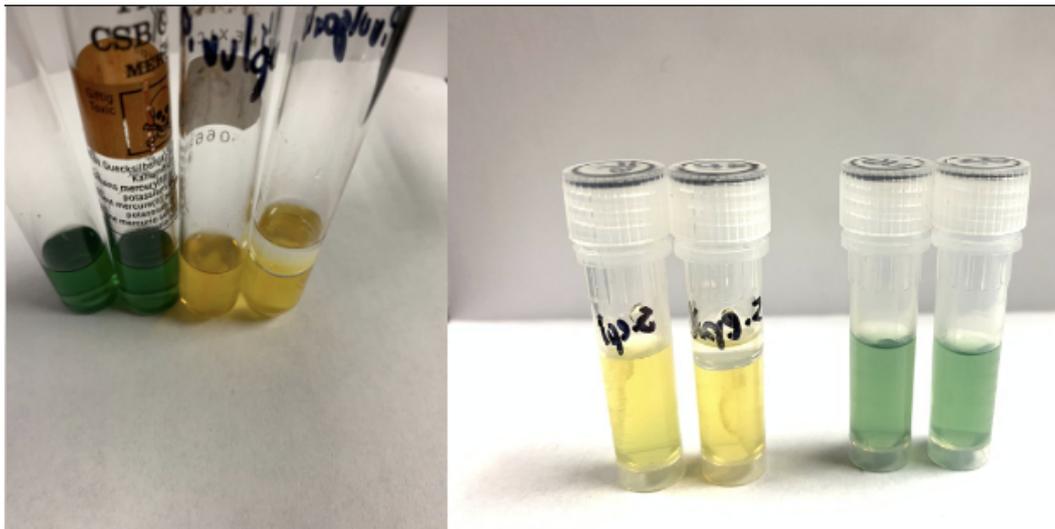


Imagen 19. Comparación de pruebas bioquímicas de tamaño normal con un volumen aproximado de ± 2 mL. y de tamaño pequeño con un volumen aproximado de ± 0.5 mL. (Viéndose de izquierda a derecha)

8.- Discusión.

Dentro de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, se imparten diversas asignaturas correspondientes al área de microbiología, donde a diario se utilizan medios de cultivo y numerosas pruebas bioquímicas que permiten la enseñanza en la identificación adecuada de enterobacterias .

Con frecuencia, la identificación apropiada del género y la especie requiere algunas consideraciones: a) la muestra o fuente clínica, b) la morfología en la coloración de Gram y c) las características del cultivo (pigmentación, hemólisis) junto con pruebas bioquímicas.

8.1.- Discusión de pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas utilizan numerosos reactivos para realizar la identificación precisa de diversas cepas de interés médico. Los procedimientos que se llevan a cabo dentro de la universidad provocan una significativa disposición de residuos, reducen el espacio de incubación y generan un inmenso gasto de recursos económicos.

Las pruebas bioquímicas primarias y secundarias, sirven para la identificación certera de cepas bacteriológicas, en este proyecto se buscó micro estandarizar las pruebas al reducir el tamaño de los tubos, y por lo tanto reducir el volumen de medio preparado para cada una de las pruebas, a su vez se buscó aumentar el espacio requerido para su incubación y posterior lectura.

Es necesario ser flexible cuando se interpretan resultados bioquímicos. Todos los microorganismos no siempre exhiben todos los resultados de la batería de pruebas bioquímicas que figuran en los cuadros. A veces es necesario el "mejor encaje" para una correcta identificación. Entre más resultados puedan obtenerse, mejores posibilidades existen de una adecuada identificación. (Mcfaddin. 2003)

Dentro de las múltiples clasificaciones que tienen los medios de cultivo, el estado físico es una de las más importantes; sabemos que existen medios líquidos, sólidos y semisólidos. Los medios líquidos son los que se presentan en este estado, denominándose por esta razón caldos. Se utilizan fundamentalmente cuando se pretende la obtención de una suspensión bacteriana de una determinada concentración.

Los medios sólidos se preparan a partir de medios líquidos, agregándoles un agente gelificante. Se utilizan para obtener bacterias aisladas por la formación de colonias sobre la superficie y para el estudio de la morfología colonial.

Por último, los medios semisólidos se utilizan para estudiar la motilidad de las bacterias. Tienen un menor porcentaje de agar, por lo que no solidifican totalmente a temperatura ambiente.

El propósito de este proyecto es disminuir significativamente los recursos utilizados en la realización de medios de cultivo, con la meta de reducir material, aumentar espacio y aminorar los residuos. Usualmente se tiene estandarizado una cantidad específica por tubo para cada medio de cultivo, por lo que se busco en este estudio, la posibilidad de obtener los mismos

resultados en tubos de menor tamaño con tapones de polipropileno libres de pirógenos, los cuales se obtuvieron de la distribuidora LONZA.

Inicialmente se obtuvieron cepas a partir de muestras clínicas, estas fueron preservadas previamente mediante un proceso de criopreservación, y posteriormente recuperadas para su uso.

La recuperación de las cepas se llevó a cabo en Caldo tioglicolato, el cual favorece el crecimiento de anaerobios, aerobios, microaerófilos, y microorganismos exigentes. Contiene 0,75% de agar para evitar que las corrientes de convección transporten el oxígeno atmosférico a toda la masa del caldo. Actúa como agente reductor, disminuyendo el potencial de oxidorreducción del medio. Con el agregado de muchos nutrientes como caseína, extractos de levadura y extracto de carne, vitaminas y otros, el medio permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias de interés clínico.

Una vez recuperadas las cepas, se continuó el procedimiento sembrando las cepas en medios de cultivo no selectivos, para que se permitiera su crecimiento y además se pudiera observar y determinar la morfología de cada una de las cepas. Asimismo se realizaron las pruebas bioquímicas primarias correspondientes: Tinción Gram, Oxidasa, Catalasa, O/F, motilidad. Estas pruebas permiten determinar el género al que pertenece el aislamiento, una vez determinado el género se realizaron pruebas bioquímicas secundarias para la caracterización de la especie. Estas pruebas bioquímicas secundarias se realizaron de manera estándar, de igual forma se redujo el tamaño de los tubos en los que se realiza cada una, con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con las pruebas de tamaño habitual.

Para los medios líquidos reducimos el volumen de 3 ml que usualmente se utiliza, a únicamente 0,5 ml por tubo. Para las pruebas de rojo de metilo, Voges Proskauer, urea, malonatos y nitratos, se realizó una comparación de cada resultado obtenido, con los tubos de tamaño estándar, obteniendo los mismos resultados, y permitiendo así su identificación adecuada.

El proceso se repitió para los medios semisólidos, pues el volumen que se utilizó para realizar las pruebas fue de 0,7 ml por tubo, donde se obtuvieron resultados similares para cada prueba de este tipo, se debe mencionar que existen pruebas que requieren de determinados reactivos de lectura para otorgar un resultado, como la prueba SIM, cuya prueba de Indol requiere la adición del reactivo de Kovac's, en comparación con los tubos estándar, los tubos de esta medida reducida también requirieron una menor cantidad de reactivo de lectura, por lo que el objetivo de ahorrar reactivos se cumplió.

En cuanto a los medios de cultivo sólidos, se realizaron las pruebas agregando 0,9 ml de medio por tubo, el inconveniente con estos tubos fue que para obtener un resultado óptimo en estas pruebas es necesario tener la misma distancia tanto en el pico como en el fondo, esto por la necesidad de oxígeno que tienen las bacterias en el proceso de fermentación de los carbohidratos que se encuentran en cada una de ellas. Por lo tanto esta medida de tubos fue desechada.

De esta manera, se procedió al uso de tubos de un volumen mayor; tienen capacidad de 2 ml, donde únicamente se utilizaron 1.5 ml para realizar las pruebas permitiendo así

estandarizar de manera correcta los tubos LIA, KIA y TSI. Estos tubos permitieron la lectura adecuada de los resultados de las pruebas donde se pudo observar el viraje del indicador de cada una de estas, y en los casos en los que se produjo gas y Ácido sulfhídrico, se obtuvieron los mismos resultados en comparación con los tubos estandarizados de acuerdo a los protocolos del laboratorio.

8.2.- Discusión de criopreservación.

Una vez determinadas las especies a través del micro método, se procedió a la criopreservación; proceso que se define como un aspecto aplicado de la criobiología con el objeto de desarrollar métodos que permitan la conservación de las células a bajas temperaturas. Su objetivo es minimizar el daño de las bajas temperaturas a los materiales biológicos, permitiendo su almacenamiento durante periodos de tiempo largos. Se considera como una fuente continua de células, genéticamente estables, que pueden ser utilizadas para diferentes propósitos. (Gil-Loyzaga. 2013)

El proceso que se llevó a cabo, requirió materiales como glicerol estéril, DMSO (Dimetilsulfóxido), los cuales tienen como objetivo fungir como crioprotectores. Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro), el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor. (Pérez, 2016)

Los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular. Tanto el glicerol, como el DMSO (dimetilsulfóxido) son considerados como crioprotectores penetrantes, pues son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. El dimetilsulfóxido es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida a través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación del agua. (Pérez, 2016)

El proceso partió de una solución bacteriana, la cual utilizó caldo Mueller-Hinton como medio de cultivo, este es un medio de uso general que puede utilizarse en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos exigentes y no exigentes. Cuenta con un hidrolizado ácido de caseína y extracto de carne que aportan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas, minerales, algunas vitaminas y otros nutrientes para favorecer el crecimiento de microorganismos. La hidrólisis del almidón durante el procesamiento en autoclave proporciona una pequeña cantidad de dextrosa, que constituye una fuente de energía. ()

Una vez obtenida la solución se tomaron 800 micro litros de caldo inoculado, 100 micro litros de DMSO y 100 microlitros de glicerol estéril; completado el volumen se marcaron con un número único de identificación, y posteriormente fueron puestas a 4°C por 24 horas. Al día siguiente se llevaron a -80°C utilizando nitrógeno líquido para su preservación.

Otro de los objetivos principales, fue la disminución de residuos producidos en el uso de las pruebas bioquímicas. Para efectos de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 y de acuerdo con lo establecido en la NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente, se considera que:

Un residuo biológico-infeccioso es aquel que contiene bacterias, virus u otros microorganismos con capacidad de causar infección o que contiene toxinas producidas por microorganismos capaces de causar efectos nocivos a seres vivos o al ambiente.

La clasificación a la que pertenecen los microorganismos trabajados en este proyecto es la siguiente: Cultivos y cepas de agentes biológicos. A) Cultivos generados en los procedimientos de diagnóstico e investigación, así como los generados en la producción de agentes biológicos. B) Utensilios desechables usados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de agentes biológico-infecciosos. (9)

El procedimiento que se lleva a cabo dentro de la facultad es sencillo, pues se llevan los materiales utilizados a un proceso de inactivación el cual se logra utilizando el autoclave a una presión de 15 lb / 45 minutos. Los materiales utilizados regularmente en el laboratorio son tubos de vidrio que resisten la presión sin inconveniente alguno.

El material que se utilizó durante el proyecto, fueron tubos de polímero especial que resistió de manera adecuada la presión y la temperatura que maneja el autoclave para el proceso de inactivación de los microorganismos.

Luego de la inactivación, el material fue sometido a un lavado con detergente comercial y puesto en disposición para su reutilización, una vez recuperadas nuevas cepas y generadas nuevas pruebas bioquímicas en este material se pusieron a prueba, donde se obtuvieron los resultados esperados, cumpliendo así el objetivo de reducir el material utilizado para las pruebas bioquímicas.

Además, es necesario mencionar que la medida de los tubos permite un almacenamiento más amplio, dado que economiza el espacio dentro de la incubadora, así como en la estantería donde se resguardan para su uso posterior generando un mayor rendimiento. Estos procesos permiten también mejoras en la calidad dentro del laboratorio, así como en la enseñanza dentro de las instalaciones pues corresponde a las buenas prácticas de gestión del laboratorio dado que se ajustan a las regulaciones ambientales o sanitarias y de seguridad nacionales e internacionales.

8.3.- Discusión de medios de cultivo

8.3.1.- Agar Chocolate

Al crecer todas las bacterias sembradas en este medio demuestra su funcionalidad dado que es un agar enriquecido, por lo cual demuestra su eficacia, en donde la glucosa funciona como fuente de carbono para que se pueda degradar, y así propiciar el crecimiento bacteriano, en donde la presencia del almidón de maíz asegura que se absorban los metabolitos secundarios tóxicos producidos por las bacterias, el fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) y el fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) administrando fosfato regulando el cambio de pH para el

crecimiento de estas bacterias, en cuanto a la hemoglobina proporciona el factor X (Hemina) y Factor V (NAD) dado que al agregar la sangre desfibrinada al medio para su preparación cuando se calienta un poco más al tomar el calor café se degrada el factor V (NAD), ya que es termolábil, pero se conserva el factor X (Hemina).

Siendo así, es un medio rico para el crecimiento de cualquier bacteria como fue el caso para la mayoría de las bacterias utilizadas, dando las características morfologías coloniales de cada género bacteriano, así como los efectos de Swarming al igual que los olores característicos a tortilla y olores fétidos.

8.3.2.- Agar Sangre

El crecimiento en este agar es requerido como es característico de este medio cualquier bacteria crece siempre y cuando no necesitan requerimientos especiales como son CO₂ y/o un medio específico para su crecimiento.

En cuanto al crecimiento la infusión de músculo de corazón y peptona otorga al medio un alto valor nutritivo, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, la adición de la sangre desfibrinada ayudando al desarrollo, y ayudando a ver la presencia de la actividad hemolítica.

Para la producción de la hemólisis es por las hemolisinas O y S que actúan hidrolizando la membrana celular de los eritrocitos.

En el caso del crecimiento del **Streptococcus Grupo B** produce una hemólisis de coloración verdosa denominada como hemólisis alfa o incompleta alrededor de la colonia, debido a la salida de la hemoglobina, oxidación del grupo hemo y la producción de biliverdina (color verdoso) en la periferia de la colonia.

En el caso del crecimiento del **Streptococcus Grupo A**, produciendo una hemólisis translúcida alrededor de la colonia, denominada Beta o lisis completa de los eritrocitos, esto debido a la hidrólisis de los enlaces éster y la utilización de los productos de los ácidos grasos por las bacterias.

Y en el caso de las demás bacterias no sintetizan hemolisinas, por lo cual hay ausencia de hemólisis en todos los demás crecimiento bacterianos.

8.3.3.- Agar Mac Conkey

El agar Mac Conkey es un medio selectivo y diferencial, en donde las peptonas son la fuente de nitrógeno, las sales biliares y el cristal violeta inhibe, el desarrollo de las bacterias gram positivos, la lactosa es el carbohidrato metabolizable para el crecimiento de la bacteria y contar con un indicador de pH en este caso rojo neutro que indicara si se acidificara tendrá un cambio de color rosa o se alcaliniza el medio tendrá un color amarillo.

Por ello para las bacterias: **Alcaligenes faecalis, Burkholderia cepacea, Citrobacter koseri, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida,** muestran crecimiento bacteriano de una coloración rosa, dicha coloración es debida a la acidificación del medio por la fermentación de la lactosa como fuente de carbono principal esto siendo apreciable a la vista por el indicador de pH rojo neutro dado que al fermentarse la principal fuente de carbono produce ácidos y el pH baja por lo que en

el caso del rojo neutro las colonias toman una coloración rosa y dichas bacterias de las bacterias tienen su morfología colonial característica.

Para el caso de las bacterias: *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi* muestran crecimiento bacteriano de coloración amarillo debido a la alcalinización del medio dado que metabolizan las peptonas en lugar de la lactosa y producen amoníaco siendo así, alcalinizan el medio siendo apreciable a la vista por el indicador de pH rojo neutro dado que se alcaliniza por la producción de amoníaco y el pH sube, por lo que en el caso del rojo neutro las colonias toman una coloración amarilla y solo una bacteria tiene su morfología colonial característica como es el caso para *Salmonella typhi* y que el efecto de Swarming para *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris* no se muestra la morfología colonial.

Para las bacterias *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* son inhibidas por la acción de las sales biliares y cristal violeta que eviten el desarrollo bacteriano de las bacterias gram positivas como es en el caso de estas dos bacterias.

Para las bacterias *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* no tuvieron desarrollo bacteriano a pesar de que estaban sembradas en un medio donde era propicio el desarrollo bacteriano ya que cumplían con las características para poder desarrollarse, esto en consecuencia de diferentes factores como la viabilidad de las bacterias o la falta de O₂ para su crecimiento o la temperatura no fue la ideal para su crecimiento.

8.3.4.- Agar Verde Brillante

El agar Verde Brillante es un medio selectivo, en donde la peptona y el extracto de levadura son fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales, el verde brillante actúa como agente selectivo inhibidor de bacterias gram positivas, la lactosa y la sacarosa como los carbohidratos metabolizables para el desarrollo bacteriano y un indicador de pH que para este medio es el rojo de fenol que indicara si se acidificara tendrá un cambio de color amarillo o se alcaliniza el medio tendrá un color rojo.

Por ello para las bacterias: *Alcaligenes faecalis*, *Burkholderia cepacea*, *Citrobacter koseri*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, muestran crecimiento bacteriano de una coloración amarillo verdoso, dicha coloración es debida a la acidificación del medio por la fermentación de la lactosa y sacarosa como fuentes de carbono principales esto siendo apreciable a la vista por el indicador de pH rojo de fenol dado que al fermentarse la principal fuente de carbono produce ácidos y el pH baja por lo que en el caso del rojo de fenol las colonias toman una coloración amarillo verdoso y dichas bacterias se observan tienen su morfología colonial característica.

Para el caso de las bacterias: *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas putida* muestran crecimiento bacteriano de coloración blanco debido a la alcalinización del medio dado que metabolizan las peptonas en lugar de la lactosa y la sacarosa, siendo así producen amoníaco, alcalinizan el medio siendo apreciable a la vista, aunque el indicador de pH rojo de fenol dado que se alcaliniza por la producción de amoníaco y el pH sube, por lo que en el caso del rojo de fenol las colonias deberían de tomar una coloración blanca pero sin embargo debajo del medio de las bacterias si cambia de color rojo-rosa y dichas bacterias se observan tienen su morfología colonial característica.

Para las bacterias **Morganella morganii, Providencia stuartii** no tuvieron desarrollo bacteriano a pesar de que estaban sembradas en un medio donde era propicio para el desarrollo bacteriano ya que cumplían con las características para poder desarrollarse esto dispuesto por diferentes factores con la viabilidad de las bacterias o la falta de O₂ para su crecimiento o la temperatura no fue la ideal para su crecimiento, además que se cuenta con un inhibidor de desarrollo bacteriano, ya que el verde brillante inhiben el desarrollo bacteriano de bacterias gram positivos.

8.3.5.- Agar XLD

El agar XLD es un medio moderadamente selectivo y diferencial, el cual contiene extracto de levadura como fuente de nutrientes y vitaminas, el desoxicolato de odio como agente selectivo inhibidor del crecimiento de bacterias gram positivas, donde la xilosa como el carbohidrato metabolizable para el desarrollo bacteriano, la lisina que ayuda a la diferenciación del género Salmonella spp, adema de contar con tiosulfato sódico y citrato férrico para identificar la producción de Sulfuro de Hidrogeno (H₂S) y un indicador de pH que para este medio es el rojo de fenol que indicara si se acidificara tendrá un cambio de color amarillo o se alcaliniza el medio tendrá un color rojo.

En cuanto el crecimiento de las bacterias: **Alcaligenes faecalis, Burkholderia cepacea, Citrobacter koseri, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa**, muestran crecimiento bacteriano de una coloración amarillo , dicha coloración es debida a la acidificación del medio por la fermentación de la xilosa como fuente de carbono principal esto siendo apreciable a la vista por el indicador de pH rojo de fenol dado que el fermentarse la principal fuente de carbono produce ácidos y el pH baja por lo que en el caso del rojo de fenol las colonias toman una coloración amarillo y dichas bacterias se observan tienen su morfología colonial característica.

Para el caso de las bacterias: **Proteus mirabilis, Pseudomonas putida, Serratia marcencens** muestran crecimiento bacteriano de coloración rojo debido a la alcalinización del medio dado que metabolizan las peptonas por medio del extracto de levadura en lugar de la xilosa, siendo así producen amoniaco, alcalinizan el medio siendo apreciable a la vista, aunque el indicador de pH rojo de fenol dado que se alcaliniza por la producción de amoniaco y el pH sube, por lo que en el caso del rojo de fenol las colonias toman una coloración de la bacterias si cambia de color rojo y dichas bacterias se observan tienen su morfología colonial característica.

En cuanto para el caso de la **Salmonella typhi**, en donde la lisina se incluye para diferenciar el grupo Salmonella de los organismos no patógenos, dado que, sin lisina esta bacteria utilizaría la xilosa como principal fuente de carbono la fermentaría rápidamente, pero cuando metaboliza por completo el suministro de xilosa, la lisina es degradada por la enzima lisina descarboxilasa, lo que genera que el pH suba y que por medio del indicador de pH rojo de fenol en donde el crecimiento bacteriano forma colonias de color rojo en donde se imita el crecimiento de las bacterias del género Shigella, además de este crecimiento bacteriano tiene un centro negro en las colonias de color rojo, este centro de color negro es apreciable a la vista por la producción de Sulfuro de hidrogeno (H₂S) mediante la formación del un precipitado que es Sulfuro de hierro (FeS) por el citrato férrico que tiene el medio y el tiosulfato de sodio.

Para las bacterias **Enterococcus faecalis y Staphylococcus aureus** son inhibidas por la acción del desoxicolato de sodio que evitan el desarrollo bacteriano de las bacterias gram positivas como es en el caso de estas dos bacterias.

Para las bacterias **Morganella morganii, Providencia stuartii** no tuvieron desarrollo bacteriano a pesar de que estaban sembradas en un medio donde era propicio para el desarrollo bacteriano ya que cumplían con las características para poder desarrollarse esto dispuesto por diferentes factores con la viabilidad de las bacterias o la falta de O₂ para su crecimiento o la temperatura no fue la ideal para su crecimiento, además que se cuenta con un inhibidor de desarrollo bacteriano, ya que el verde brillante inhiben el desarrollo bacteriano de bacterias gram positivos.

8.3.6.- Agar Salmonella-Shigella

El agar Salmonella-Shigella, el cual es un medio selectivo y de diferenciación, que contiene peptona como principal fuente de nitrógeno aportando nutrientes, utilizando la lactosa como fuente principal de carbohidratos fermentable para el crecimiento bacteriano, donde la alta concentración de sales biliares y en bajas concentraciones de verde brillante que inhiben el desarrollo de bacterias gram positivas, también ayuda la identificación de la formación de Sulfuro de Hidrogeno (H₂S) por medio ya que el medio cuenta con tiosulfato de sodio y citrato férrico, y cuenta con un indicador de pH en este caso rojo neutro que indicara si se acidificara tendrá un cambio de color rosa o se alcaliniza el medio tendrá un color amarillo.

En cuanto el crecimiento de las bacterias: **Alcaligenes faecalis, Burkholderia cepacea, Citrobacter koseri, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae,** muestran crecimiento bacteriano de una coloración rosa , dicha coloración es debida a la acidificación del medio por la fermentación de la lactosa como fuente de carbono principal esto siendo apreciable a la vista por el indicador de pH rojo neutro dado que el fermentarse la principal fuente de carbono produce ácidos y el pH baja por lo que en el caso del rojo de fenol las colonias toman una coloración rosa y dichas bacterias se observan tienen su morfología colonial característica. Para el crecimiento bacteriano de la bacteria Citrobacter koseri, además de este crecimiento bacteriano tiene un centro negro en las colonias de color rosa, este centro de color negro es apreciable a la vista por la producción de Sulfuro de hidrogeno (H₂S) mediante la formación del un precipitado que es Sulfuro de hierro (FeS) por el citrato férrico y el tiosulfato de sodio presentes en el medio.

Para el caso de las bacterias: **Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas putida, Salmonella typhi** muestran crecimiento bacteriano de coloración amarillo debido a la alcalinización del medio dado que metabolizan las peptonas en lugar de la xilosa, siendo así producen amoniaco, alcalinizan el medio siendo apreciable a la vista, aunque el indicador de pH rojo neutro, dado que se alcaliniza por la producción de amoniaco y el pH sube, por lo que en el caso del rojo de neutro las colonias toman una coloración de la bacterias si cambia de color amarillo y dichas bacterias se observan tienen su morfología colonial característica.

Para las bacterias como son **Proteus mirabilis y Salmonella typhi** tiene un centro negro en las colonias de color amarillo solo para Salmonella por que para Proteus se ve disperso por el efecto de Swarming, este centro de color negro es apreciable a la vista por la producción de Sulfuro de hidrogeno (H₂S) mediante la formación del un precipitado que es Sulfuro de hierro (FeS) por el citrato férrico y el tiosulfato de sodio presentes en el medio.

Para las bacterias **Enterococcus faecalis y Staphylococcus aureus** son inhibidas por la acción de la alta concentración de sales biliares y en bajas concentraciones de verde brillante que inhiben el desarrollo de bacterias gram positivas como es en el caso de estas dos bacterias.

Para las bacterias **Morganella morganii, Providencia stuartii** no tuvieron desarrollo bacteriano a pesar de que estaban sembradas en un medio donde era propicio para el desarrollo bacteriano ya que cumplían con las características para poder desarrollarse esto dispuesto por diferentes factores con la viabilidad de las bacterias o la falta de O₂ para su crecimiento o la temperatura no fue la ideal para su crecimiento, además que se cuenta con un inhibidor de desarrollo bacteriano, ya que el verde brillante inhiben el desarrollo bacteriano de bacterias gram positivos.

8.3.7.- Agar Sulfito Bismuto

El agar sulfito bismuto es un medio selectivo y diferencial, el cual contiene extracto de carne y peptona de carne los cuales proveen de la fuente principal de nitrógeno, vitaminas, aminoácidos y minerales al medio, la glucosa es nuestra principal fuente de carbohidrato la cual se metaboliza para propiciar el desarrollo bacteriano, el fosfato dibásico de sodio es un regulador de pH al medio, el sulfito bismuto y el verde brillante se encargan de inhibir el desarrollo de las bacterias gram positivas.

En cuanto el crecimiento de las bacterias: **Alcaligenes faecalis, Burkholderia cepacea, Citrobacter koseri, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa** muestran crecimiento bacteriano de una coloración negro metálico, dicho crecimiento bacteriano es debido a la fermentación de la glucosa como fuente de carbono principal esto siendo apreciable a la vista el color negro metálico es apreciable a la vista por la producción de Sulfuro de hidrogeno (H₂S) mediante la formación del un precipitado que es Sulfuro de hierro (FeS) por el citrato férrico y el tiosulfato de sodio presentes en el medio , además del color metálico es por la reducción de los iones del bismuto a bismuto metálico produciendo así este brillo y dichas bacterias se observan tienen su morfología colonial característica.

Para las bacterias **Enterococcus faecalis** es inhibida por la acción del sulfito bismuto y el verde brillante que inhiben el desarrollo de bacterias gram positivas como es en el caso de esta bacteria.

Para las bacterias **Morganella morganii, Providencia stuartii y Serratia marcescens** no tuvieron desarrollo bacteriano a pesar de que estaban sembradas en un medio donde era propicio para el desarrollo bacteriano ya que cumplían con las características para poder desarrollarse esto dispuesto por diferentes factores con la viabilidad de las bacterias o la falta de O₂ para su crecimiento o la temperatura no fue la ideal para su crecimiento, además que se cuenta con un inhibidor de desarrollo bacteriano, ya que el verde brillante inhiben el desarrollo bacteriano de bacterias gram positivos, además de que sulfito bismuto y el verde brillante también inhibe algunos coliformes.

8.3.8.- Medio Mueller Hilton

El medio Mueller Hilton es un medio rico utilizado para prueba de susceptibilidad a los antibióticos por el método de Kirby-Bauer, en donde el almidón actúa como factor de crecimiento e inhibe la producción de los metabolitos secundarios tóxicos, en donde la infusión deshidratada de carne de res aporta los nutrientes metabolizables para poder propiciar el desarrollo bacteriano y la peptona de caseína aporta la fuente principal de nitrógeno, vitaminas, aminoácidos y minerales al medio.

Por ello las bacterias: *Alcaligenes faecalis*, *Burkholderia cepacea*, *Citrobacter koseri*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, forman desarrollo bacteriano debido a que se metaboliza la infusión deshidratada de carne de res para producir ácido, la cual ayuda al desarrollo bacteriano al igual que para algunas bacterias la peptona ayuda también a metabolizarse y producir amoníaco donde las colonias son de color blanco y forman su característica morfología bacteriana.

8.3.9.- Medio Cetrimida

Este medio es selectivo el cual tiene la peptona como fuente de nitrógeno principal, el glicerol se utiliza como fuente de carbono metabolizable, además de que en este medio nos muestra la producción de pigmentos por determinados géneros bacterianos, así como contar con agente inhibitorio, el cual es la cetrimida (bromuro de cetil trimetil amonio) es un compuesto de amonio cuaternario que inhibe el desarrollo bacteriano de gran variedad de microorganismos, además de que el medio contiene cloruro de magnesio y sulfato de potasio.

En cuanto al crecimiento de las bacterias: *Alcaligenes faecalis*, *Burkholderia cepacea*, *Citrobacter koseri*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens* muestran crecimiento bacteriano de una coloración blanco, dicho crecimiento bacteriano es debido a la metabolización del glicerol como fuente de carbono principal esto siendo apreciable a la vista el color blanco y dichas bacterias se observan tienen su morfología colonial característica.

Para el caso del desarrollo bacteriano de la *Pseudomonas aeruginosa* este muestra crecimiento bacteriano de una coloración azul verdosa, dicho crecimiento bacteriano es debido a la metabolización del glicerol como fuente de carbono principal, en cuanto a la coloración azul-verdosa es debido a que el medio propicia que el pigmento piocianina que produce la *Pseudomonas aeruginosa* sea visible ya que el medio contiene cloruro de magnesio y sulfato de potasio estimulan la producción de este pigmento el cual puede ser apreciable a la vista.

En cuanto a las bacterias: *Enterococcus faecalis*, *Providencia stuartii*, *Staphylococcus aureus* son inhibidas por la acción de la cetrimida (bromuro de cetil trimetil amonio) el cual inhibe a determinadas especies de microorganismos como es en estos tres géneros bacterianos.

8.3.10.- Agar Sales y Manitol

Es un medio altamente selectivo por sus alta concentración de cloruro de sodio de 75 g/L , el cual contará como agente inhibitorio del desarrollo de la flora acompañante, en donde el manitol es la fuente de carbohidratos metabolizable, con extracto de carne y pluripeptona que son fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales y un indicador de pH que para este medio es el rojo de fenol que indicara si se acidificara tendrá un cambio de color amarillo o se alcaliniza el medio tendrá un color rojo.

En cuanto el crecimiento de las bacterias: *Alcaligenes faecalis*, *Staphylococcus aureus* muestran crecimiento bacteriano de una coloración amarillo , dicha coloración es debida a la acidificación del medio por la fermentación del manitol como fuente de carbono principal esto siendo apreciable a la vista por el indicador de pH rojo de fenol dado que el fermentarse la principal fuente de carbono produce ácidos y el pH baja por lo que en el caso del rojo de fenol las colonias toman una coloración amarillo, además de tolerar la alta concentración de cloruro de sodios en el medio de 75 g/L y dichas bacterias se observan tienen su morfología colonial característica.

En cuanto a las bacterias: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* son inhibidas por la acción de la alta concentración de cloruro de sodio de 75 g/L en el medio, el cual inhibe a determinadas especies de microorganismos como es para estos géneros bacterianos.

8.3.11.- Medio EMB (Eosina Azul de Metileno)

Es un medio ligeramente selectivo y diferencial, en donde la peptona es la principal fuente de nitrógeno, la sacarosa y la lactosa son las principales fuente de carbohidratos metabolizable, además de contar con colorantes de eosina y el azul de metileno como inhibidores del desarrollo de bacterias gram positivas ,además de que la combinación de estos colorantes forman un precipitado de color verde metálico cuando el pH baja y se acidifica o también formar colonias rosas, guinda y/incoloras.

En cuanto el crecimiento de las bacterias: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, muestran crecimiento bacteriano de una coloración verde metálico , dicha coloración es debida a la acidificación del medio por la metabolización de la lactosa y sacarosa como fuentes principales de carbono esto siendo apreciable a la vista por la combinación de los colorantes eosina y azul de metileno dado que el fermentarse las principales fuentes de carbono produce ácidos y el pH baja por lo que en el caso de la combinación de los colorante las colonias toman una coloración verde metálico y dichas bacterias se observan tienen su morfología colonial característica.

Para el caso de la bacteria *Pseudomonas putida* muestra crecimiento bacteriano en donde fue de coloración traslúcida , dicha coloración es debida a la acidificación del medio por la metabolización de la lactosa y sacarosa como fuentes principales de carbono esto siendo apreciable a la vista por la combinación de los colorantes eosina y azul de metileno dado que el fermentarse las principales fuentes de carbono produce ácidos y el pH baja por lo que en el caso de la combinación de los colorante las colonias toman una coloración traslúcida y dichas bacterias se observan tienen su morfología colonial característica.

Para las bacterias: **Enterococcus faecalis** es inhibida por la combinación de los colorantes eosina y azul de metileno inhiben el desarrollo de bacterias gram positivas como es en el caso de esta bacteria.

Para las bacterias: **Morganella morganii, Providencia stuartii y Serratia marcescens** no tuvieron desarrollo bacteriano a pesar de que estaban sembradas en un medio donde era propicio para el desarrollo bacteriano ya que cumplían con las características para poder desarrollarse esto dispuesto por diferentes factores con la viabilidad de las bacterias o la falta de O₂ para su crecimiento o la temperatura no fue la ideal para su crecimiento.

8.3.12.- Medio SDA (Sabouraud Dextrosa Agar)

Es un medio utilizado para el aislamiento y desarrollo de hongos patógenos y no patógenos, en donde la peptona al ser la principal fuente de carbono, la dextrosa como la principal fuente de carbohidratos metabolizable para propiciar el desarrollo de levaduras y hongos miceliales y la tripteína aporta vitaminas y minerales al medio.

Por lo tanto para las levaduras utilizadas y sembradas como son: **Candida albicans, Candida krusei, Candida tropicalis y Candida parapsilosis** muestran desarrollo colonial, por medio de la metabolización de la dextrosa como la principal fuente de carbohidratos, además de que este tipo de hongo se desarrolla en forma de colonias a diferencia de los hongos que en su mayoría tiene forma de micelios en este caso apreciablemente el micelio aéreo, ya que este Género el crecimiento en este medio son levaduras por lo tanto formación de colonias.

9.- Conclusiones

Por concluir en cuanto a la estandarización de las pruebas bioquímicas secundarias y pruebas de O/F se puede comprobar la misma efectividad y reproducibilidad que que las pruebas bioquímicas secundarias de tamaño normal claro con una cantidad menor de medio para cada tubo, siendo más eficaz como es la prueba de Voges Proskauer que con una incubación de 24 horas a 37°C es posible la lectura de la prueba en la mitad del tiempo con la adición de los reactivos, en lugar de la prueba bioquímica secundaria de tamaño normal que para leerla es necesarias las condiciones de 48 horas a 37°C, demostrando un mejora al menos en esta prueba bioquímica secundaria, en cuanto a las demás pruebas bioquímicas secundarias de tamaño pequeño funciona igual que las de tamaño grande para las bacterias de interés médico seleccionadas esto siendo comprobado por las pruebas donde está siendo reproducible el resultado para las pruebas bioquímicas secundarias en microtubo, además de que se ve una menor deshidratación de las pruebas bioquímicas en microtubo a comparación de las pruebas bioquímicas de tamaño normal. En cuanto a la reducción de uso de reactivos utilizados para la lectura, así como el instrumental se ve reducido ya que solo se utiliza 1 gotas de cada reactivo o aceite mineral para sellar los tubos, al igual que la reducción en cantidad de agua destilada y medio deshidratado utilizado.

En cuanto a los agares en microplacas para el sembrado de las especies bacterianas para observar el crecimiento, así como la morfología colonial para diversas bacterias de interés médico que fueron seleccionadas se muestran los resultados similares a las placas de agar de tamaño normal, al igual que la inhibición del crecimiento, pero en cuanto a las bacterias como son **Morganella morganii, Providencia stuartii y Serratia marcescens** no hubo crecimiento en algunos agares en microplaca que son ideales para su identificación y crecimiento, estos siendo posible por la viabilidad de las bacterias utilizada para poder sembrar los agares en microplaca o la falta de O₂, aunque en estos géneros bacterianos no se demostró la efectividad de las microplacas de agar, pero siendo efectivo en los demás géneros bacterianos de interés médico utilizados, además de que las microplacas de agar no se deshidratan tan fácil como son los agares de tamaño normal. Para la reducción de residuos en este caso es importante resaltar la cantidad de agua destilada como de medio deshidratado y el instrumental utilizado y la cantidad se ve claramente reducida por medio al igual que la cantidad de matraces utilizado para poder realizar la autoclave.

Aunque de utilidad en el diagnóstico y enseñanza tanto en los agares en microplaca y las pruebas bioquímicas secundarias en microtubo son útiles y efectivos, se recomienda más para las pruebas de control de calidad para medios de cultivo y pruebas bioquímicas secundarias, aunque en la enseñanza sería la mejora y práctica en las técnicas de sembrado en placa agar para el manejo de este tipo de materiales, al igual que el almacenamiento tanto para pruebas bioquímicas secundarias, pruebas de O/F y las microplacas de agar resulta ser mucho más eficiente dado por el tamaño y siendo así más fácil y el espacio es mucho mejor para almacenar más cajas de este tamaño, igualmente en la reducción de residuos se ve una enorme diferencia ya que después de desecharlo conforme a la NOM-087, por lo que un en el caso de los microtubos utilizados para las pruebas bioquímicas secundarias como también de O/F se pueden reutilizar siempre y cuando revisando su integridad del microtubo para su posterior uso y su adecuada limpieza.

Y se pudo realizar un catálogo de las pruebas bioquímicas y microplacas en agar para las bacterias de interés médico y utilizadas para la enseñanza en la Facultad de estudios Superiores Cuautitlán, demostrando la morfología colonial obtenida de cada género bacteriana, al igual que su comportamiento en cada prueba bioquímica.

10.- Referencias.

1. Arregui L. (2014) Microbiología. Cuestiones y casos prácticos resueltos, Pearson. 45-47
2. Barrer M. (2019) Medical microbiology a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory investigation and control, Elsevier.69-73
3. Beckett, G., Walker, S. y Rae, P. (2010). *Clinical Biochemistry*. Wiley-Blackwell.111-128
4. Bizzini,A. et al. (2010).Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 94-97
5. Braun S. P. (2017) General and applied microbiology, Magnum Publishing. 214-225
6. MIO Medio Britania lab, Recuperado el 12 de Marzo del 2022, de https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070743f4ed75.pdf.
7. Cassio Luiselli Fernandez, Ernesto Enríquez Rubio. (2003)NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.. 24 de Enero del 2019, de Diario Oficial de la Federación Sitio web: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>.
8. Castro A. (2014) bacteriología médica basada en problemas, El manual moderno. 3-45
9. Connie R. , Donald C., (2020). Diagnostico Microbiologico. Amolca. 231-303
10. Cowan S. T. (2004) Manual for the identification of medical bacteria, Cambridge University Press.163-221
11. Farias, M. (2015). Fundamentos de bacteriología. México : Trillas. 85-143
12. Forbes, B. A. (2009). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana.121-140

13. García, P. et al. (2014). Pruebas bioquímicas tradicionales y de alta resolución para identificación manual de enterobacterias Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 249-254
14. Granero, S. C. C. R. (2017). Técnicas básicas de microbiología y bioquímica. Editorial Síntesis, S.A. 147- 175
15. Ingraham J. (2004) Introduction to microbiology, Thomson Learning.13-43
16. Kenneth, R., Ray G., (2017). Sherris. Microbiología Médica. 6a. Ed. McGraw-Hill. 77-131
17. Md Ms, G. P. W., Koneman, E. W. (2017). Koneman. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas (Seventh ed.). LWW.173-302, 670-862
18. MacFaddin, J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Argentina: Médica Panamericana.8-59, 73-78, 81-83, 98-101, 104, 128-135, 240-273,326-339,354-360, 397-402,512-521
19. Madigan M (2009) Brock biology of microorganisms, Pearson. 163- 215
20. Mahon C. (2015) Textbook of diagnostic microbiology, Elsevier. 371-399
21. Molina J. (2019) Microbiología y parasitología medicas de Tay, Mendez Editores. 269-293
22. Murray, R.P., (2018). Microbiología Médica Básica. Elsevier. 220- 224
23. Nester E. (2007) Microbiología humana, El manual moderno. 156-163
24. Pérez, P. L. A., Cortés, R. T. (2016). Criobiología: Criopreservación de microorganismos y de otras fuentes biológicas a bajas temperaturas (Spanish Edition) [Libro electrónico]. En Criobiología: Criopreservación de microorganismos y de otras fuentes biológicas a bajas temperaturas (Spanish Edition) (Primera ed., pp.105-110). Publicia.<https://books.google.com.mx/books?id=hGbQjwEACAAJ&dq=Criobiolog%C3%ADa:&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjc9NvrzqjtAhUFS6wKHajrBPEQ6AEwAHoECAlQAQ>.
25. Picazo De la Garza.,(2016) Compendio de Microbiología. Elsevier. 385-408

26. Prats, G. (2006). Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana.77-83
27. Riedel, S. (2020). Microbiología Médica., McGraw-Hill.54-60
28. Romero, C. (2018). Microbiología y Parasitología Humana Ed. Medica Panamericana.
37-49
29. Spivak, E. et al. (2006). “El árbol de la vida: una representación de la evolución y la evolución de una representación”, *Ciencia Hoy*. 16:11- 24.
30. Spicer, J., (2016). Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas. Texto y Atlas.
Elsevier. 317-340
31. Struthers, K. el al. (2018). Microbiología Clínica, Manual Moderno. 105-132
32. Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). Introducción a la microbiología.
Editorial Médica Panamericana. 2-50