



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“AISLAMIENTO DE BACTERIAS ESPORULADAS EN MEDIOS DE  
CULTIVO MODIFICADOS PARA ANAEROBIOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

**NICOLE DANAÉ ÁVILA BASURTO**

ASESORA:

**Q.F.B. LETICIA CUBILLO CARRILLO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**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. MARIA 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 la: **Tesis y Examen Profesional**

**Aislamiento de bacterias esporuladas en medios de cultivo modificados para anaerobios**

Que presenta la pasante: **Nicole Danaé Ávila Basurto**

Con número de cuenta: **315146260** para obtener el título de: **Licenciada 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 17 de Agosto de 2023.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Bertha Ortíz Vázquez	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Erik González Ballesteros	
<b>SECRETARIO</b>	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q. F.B. Alma Susana García Barrón	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Dra. María Lucero Paniagua García	

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

MCVB/cga\*

# DEDICATORIA

Con amor, para mamá.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su trayectoria como alumna y así mismo, agradezco a mi querida FES Cuautitlán por encaminarme a ser lo que soy hoy en día y por brindarme un lugar seguro dentro de sus instalaciones que siempre fueron como mi segunda casa.

Agradezco también el apoyo de mi mamá, sin ti nada de esto sería posible, gracias por estar en los días buenos y en los días no tan buenos, por desvelarte conmigo, por confiar en mí y por enseñarme que todo lo que te propongas se puede lograr.

A mis hermanos Bryan e Iván, que siempre han estado para mí, enseñándome como hacer las cosas mejor cada día, los admiro muchísimo, son una luz en mi vida, gracias por siempre creer en mí.

A mis abuelos, Toñis y Cuate, por su paciencia, su amor y su apoyo todos y cada uno de los días de mi vida, esto también es de ustedes.

A Silvia, por enseñarme el verdadero valor de la amistad y por estar siempre, te quiero.

A la profesora Lety, gracias por ser tan paciente y linda, por compartir su tiempo y conocimientos conmigo.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	3
<b>3.1. BACTERIAS ESPORULADAS</b> .....	3
3.1.1. ¿Qué son? .....	3
3.1.2. Hábitat .....	4
3.1.3. Importancia clínica.....	4
<b>3.2 METABOLISMO</b> .....	4
3.2.1. Aerobio .....	5
3.2.2. Anaerobio .....	5
<b>3.3 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>BACILLUS</i></b> .....	6
<b>3.4 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>CLOSTRIDIUM</i></b> .....	8
<b>3.5. MEDIOS DE CULTIVO</b> .....	9
3.5.1. Agar Nutritivo.....	9
3.5.2. Agar Sangre .....	10
3.5.3. Medio Cooked Meat.....	11
3.5.4. Sustrato alternativo: croqueta de alimento para perro marca Ganador® ..	12
3.5.5. Sustrato alternativo: croqueta de alimento para gato marca Gatina® .....	12
3.5.6. Sustrato alternativo: Knorr® Suiza (Caldo de pollo en polvo).....	12
3.5.7 Información nutrimental de los sustratos y el medio cooked meat .....	13
<b>3.6. PRUEBAS PRIMARIAS DE IDENTIFICACION</b> .....	14
3.6.1. Tinción de Gram .....	14
3.6.2. Catalasa .....	16
3.6.3 Oxidasa .....	16
3.6.4. Motilidad .....	17
3.6.5. Oxidación/Fermentación.....	17

<b>3.7. PRUEBAS BIOQUIMICAS SECUNDARIAS DE IDENTIFICACIÓN</b> .....	18
3.7.1. Citratos .....	18
3.7.2. Nitratos .....	19
3.7.3. Rojo de Metilo (RM) – Voges Proskauer (VP) .....	20
3.7.4. Hidrólisis de gelatina.....	21
3.7.5. Hidrólisis de caseína.....	21
3.7.6. Prueba de Lecitina.....	21
<b>3.8. TINCION DE ESPORAS</b> .....	22
3.8.1. Tinción Schaeffer-Fulton.....	22
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	24
4.1. Objetivo general: .....	24
4.2. Objetivos particulares: .....	24
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	25
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	26
6.1. Listado de material, reactivos, sustancias, aparatos y equipos. ....	26
6.2 Preparación de medios alternativos.....	29
6.3 Preparación de los medios de cultivo .....	29
6.4 Preparación de las pruebas bioquímicas .....	32
6.5 Aislamiento en agar sangre .....	36
6.6 Purificación en agar nutritivo.....	36
6.7 Realización de las pruebas bioquímicas primarias y tinciones .....	37
6.8 Inoculación e interpretación de las pruebas bioquímicas secundarias .....	39
6.9 Inoculación e interpretación de los medios caseína y lecitina.....	40
6.10 Identificación de las bacterias esporuladas obtenidas .....	41
<b>7. RESULTADOS</b> .....	42
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	64

<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	70
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	71
<b>11. ANEXOS</b> .....	77
11.1 Diagramas de preparación de medios alternativos, medios de cultivo y pruebas bioquímicas .....	77
11.2. Aislamiento e identificación bacteriana.....	87
11.3. Identificación bacteriana mediante tinción de esporas .....	88
11.4 Siglas y abreviaturas .....	89

El presente trabajo se realizó dentro del laboratorio 10 de Microbiología del edificio de posgrado e investigación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. (FES-C)

## 1. RESUMEN

Los medios de cultivo son esenciales en el área de microbiología porque nos permiten aislar, crecer y diferenciar a los microorganismos de interés. Sin embargo, algunas veces estos medios pueden resultar costosos debido a su composición específica. En los laboratorios de enseñanza el uso de estos medios de alto costo puede ser limitante y no todos los alumnos pueden utilizarlo.

El objetivo de este trabajo fue encontrar una alternativa semejante al medio “cooked meat” para su utilización en los laboratorios de docencia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Para ello se compararon los sustratos: croquetas para perro marca ganador® (Var<sub>1</sub>), croquetas para gato marca gatina® (Var<sub>2</sub>) y Knorr® Suiza, caldo de pollo en polvo, (Var<sub>3</sub>).

Lo que se encontró fue un porcentaje de recuperación de bacterias esporuladas similar entre todos los medios alternativos y el cooked meat, pero con los medios Var<sub>1</sub> y Var<sub>2</sub> se aislaron más especies en comparación con Var<sub>3</sub>.

Por lo tanto, consideramos que las alternativas Var<sub>1</sub> y Var<sub>2</sub> podrían ser la más viables para utilizarse en los laboratorios por sus resultados similares a los obtenidos con el cooked meet.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las células bacterianas usualmente tienen tres formas básicas: esféricas, bacilos y espirales, la ciencia que estudia dichas características morfológicas, fisiológicas, taxonómicas y patológicas, es la bacteriología. (Silva ,2013)

Los bacilos Gram positivos formadores de esporas son bacterias de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. Los géneros de *Bacillus* son anaerobios facultativos y, los de *Clostridium* son aerobios estrictos. (Carroll, 2016)

Ambos géneros se observan microscópicamente agrupados en cadenas, son formadores de endosporas y estructuras muy resistentes, debido a dicha característica pueden vivir en el ambiente por varios años y soportar condiciones ambientales adversas. (López, 2020)

El Diccionario médico de la Universidad de Navarra (2022) especifica que producen diferentes enzimas hidrolíticas extracelulares, con las que degradan diversos sustratos, como polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos; Algunas especies son útiles para los seres humanos en varios campos, pero algunas otras suelen ser patógenas.

Para tratar de forma adecuada una enfermedad y prevenir su diseminación, un patógeno debe ser identificado con precisión, su identificación exige pruebas bioquímicas y muchas veces tinciones, en el caso de las bacterias esporuladas la tinción de Schaeffer-Fulton es la más adecuada. (Prescott, 2002).

El medio recomendado para la identificación de bacterias esporuladas es el medio Cooked Meat, que se traduce como “carne cocida” y favorece el crecimiento de la mayoría de los organismos aerobios y anaerobios formadores y no formadores de esporas. (BD, 2015)

Las croquetas y el caldo de pollo en polvo tienen características similares al medio anterior, están compuestos principalmente de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales, por lo tanto, podríamos obtener también un desarrollo óptimo de esporulados. Es importante conocer más medios de cultivos que sean viables para el aislamiento de bacterias esporuladas, sobre todo en los laboratorios de docencia.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. BACTERIAS ESPORULADAS

##### 3.1.1. ¿Qué son?

De acuerdo con la OMS 2022, las bacterias son organismos unicelulares que se encuentran en todos los ambientes y son transportados por agua, aire, insectos, plantas, animales y en ocasiones, personas. Algunas son causantes de enfermedades en los humanos y son consideradas patógenas, otras pueden ser responsables del deterioro alimenticio o de ciertos materiales, pero también, muchas son útiles para el hombre.

En el sistema actual de clasificación de los seres vivos propuesto por Woese, Kandler y Wheelis, organiza a los seres vivos en tres dominios: Bacteria: cuyos miembros son organismos procariontes, carentes de núcleo que se pueden clasificar con base en ciertos criterios: por su forma, por sus necesidades de oxígeno, por sus capacidades metabólicas o fermentadoras, por su capacidad de formar esporas y por las características de su pared celular, Archaea y Eukarya. (Rodríguez, 2021)

Las bacterias Gram positivas pueden dividirse en dos grupos: las que tienen una alta proporción de guanina + citocina y las que tienen una baja proporción, las cuales se asignan al filo Firmicutes; Este grupo incluye géneros importantes de bacterias como *Clostridium* y *Bacillus*. (Tortora, 2017)

*Clostridium* y *Bacillus* pueden formar una estructura latente, de especial resistencia, denominada **endospora**, que se desarrolla dentro de algunas células bacterianas vegetativas. (Prescott, 2004)

Cuando los nutrientes escasean, algunas bacterias esporulan. Las esporas contienen el material genético de la bacteria y resisten largos periodos sin agua ni nutrimentos, en condiciones de calor o frío extremo.

Es decir, las bacterias sufren cambios en la estructura y función para adaptarse a estas condiciones, las esporas germinan rápidamente cuando absorben agua, se disuelve su cubierta y se forma una nueva pared celular. (Elsevier, 2011)

### **3.1.2. Hábitat**

El aire contiene en suspensión diferentes tipos de microorganismos, especialmente bacterias y hongos. Algunos microorganismos se encuentran en forma de células vegetativas pero lo más frecuente son formas esporuladas, pues éstas son metabólicamente menos activas y sobreviven mejor en la atmósfera. (De la Rosa, 2002)

Las bacterias de los género *Bacillus* y *Clostridium* suelen ser bacilos que se encuentran con frecuencia en el suelo, agua y vegetación. (Tortora, 2017)

En general, las bacterias Gram positivas son más resistentes ya que su pared celular es más gruesa; Los principales factores que intervienen son: humedad, temperatura, oxígeno, materia orgánica y radiaciones. (De la Rosa, 2002)

El conocimiento del hábitat de un microorganismo es útil para elegir el medio de cultivo adecuado para sembrar su ambiente natural.

### **3.1.3. Importancia clínica**

Las bacterias esporuladas son relevantes en el área clínica debido a su impacto tanto positivo como negativo, por ejemplo, algunos miembros del género *Bacillus* producen los antibióticos bacitracina, gramicidina y polimixina, sin embargo, algunos otros son causa frecuente de intoxicaciones alimentarias como *B. cereus*, mientras que *B. anthracis* es el agente causal del carbunco, que puede afectar tanto a los animales como a los seres humanos.

El género *Clostridium* es en extremo heterogéneo y se han descrito más de 200 especies, las cepas más recientes tienen un potencial patógeno que aún no se ha establecido. (Carroll, 2016)

## **3.2 METABOLISMO**

El metabolismo es la formación y la degradación de nutrientes dentro de una célula. Estas reacciones químicas proveen energía y crean sustancias que sustentan la vida. Dos elementos fundamentales para que éstas reacciones ocurran son las enzimas y la molécula ATP. (Tortora, 2017)

Como mencionábamos anteriormente, en el laboratorio las bacterias se pueden clasificar con base en ciertos criterios, uno de ellos es dependiendo de sus necesidades de oxígeno:

### 3.2.1. Aerobio

En la respiración aeróbica, el aceptor final de electrones es el  $O_2$  (Tortora, 2017), la capacidad para usar oxígeno en la oxidación de nutrientes como la glucosa y ácidos grasos produce una cantidad de energía mucho mayor que la fermentación. (McKee, 2023)

El metabolismo aerobio consiste en los siguientes procesos bioquímicos:

1. Ciclo de Krebs
2. Cadena transportadora de electrones
3. Fosforilación oxidativa

En la imagen 1 se resume el metabolismo aerobio.

### 3.2.2. Anaerobio

También conocido como fermentación. En la respiración anaeróbica el aceptor final de electrones es una molécula inorgánica. Algunas bacterias como *Pseudomonas* y *Bacillus*, pueden utilizar el ion nitrato ( $NO_3$ ) como aceptor final de electrones. (Tortora, 2017)

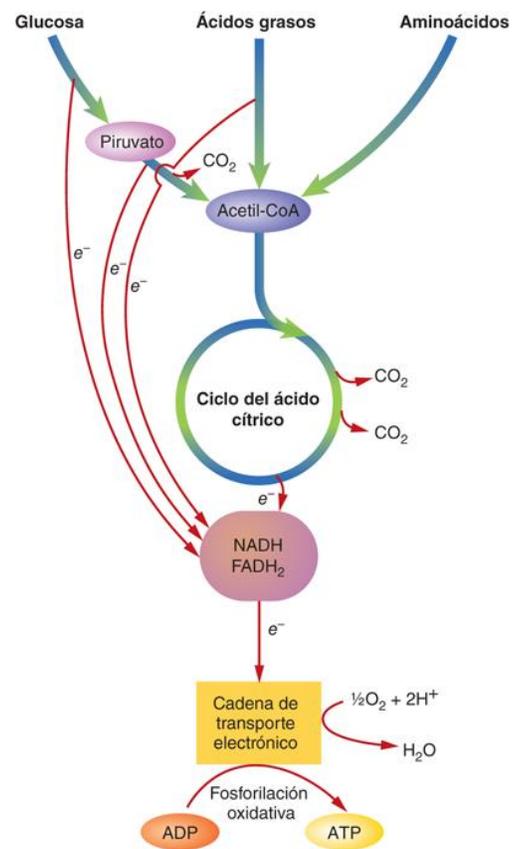


Imagen 1. Rutas metabólicas aerobias, tomado de McKee, J. (2023)

### 3.3 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *BACILLUS*

Es un género caracterizado por bacilos Gram positivos grandes, miden 1 x 3 a 4  $\mu\text{m}$ , generalmente agrupados en cadenas, formadores de endosporas, quimioheterótrofos, que normalmente son móviles rodeados de flagelos peritricos, es aerobio, aunque a veces puede ser anaerobio estricto o facultativo y son catalasa positivo. (Prescott, 2004)

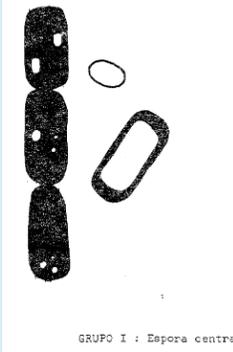
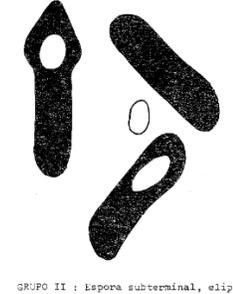
La mayor parte de los miembros de este género son saprófitos y viven en la tierra, el agua y el aire, así como en la vegetación. Los bacilos saprófitos utilizan fuentes simples de nitrógeno y carbono para obtener energía y proliferar. Las esporas son resistentes a los cambios ambientales, soportan el calor seco y algunos desinfectantes químicos. (Carroll, 2016)

Todos los microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* suelen crecer bien y esporular en agar sangre al 5% y agar chocolate incubados a 37°C en condiciones aerobias. (Hernández, 2002)

Todos los miembros del género producen lecitinasa en agar yema de huevo e hidrolizan la caseína, el almidón y la gelatina. No producen indol y la mayoría de las cepas reducen nitrato a nitrito. (Tamez, 2013)

La clasificación del género *Bacillus* se facilita por la forma y posición diferentes de las esporas según la especie. Esta característica permite dividirlos en tres grupos que se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación del género *Bacillus*

Grupo	Esporas	Esporas	Descripción gráfica
I	Elipsoidales o cilíndricas, centrales o terminales	No deformantes	 <p> <u>B. megaterium</u>  <u>B. cereus</u>            var. <u>mycoides</u>            var. <u>thuringiensis</u>            var. <u>anthracis</u>  <u>B. licheniformis</u>  <u>B. subtilis</u>            var. <u>aterrimus</u>            var. <u>niger</u>  <u>B. pumilus</u> </p> <p>GRUPO I : Espora central, no deforma el esporangio.</p>
II	Elipsoidales, centrales o terminales	Distención y deformantes	 <p> <u>B. polymyxa</u>  <u>B. macerans</u>  <u>B. stearothermophilus</u>  <u>B. circulans</u>  <u>B. alvei</u>  <u>B. laterosporus</u>  <u>B. pulvificans</u>  <u>B. brevis</u> </p> <p>GRUPO II : Espora subterminal, elipsoidal y con deformación del esporangio</p>
III	Esféricas	Distención, aspecto de alfiler.	 <p> <u>B. pantothenicus</u>  <u>B. sphaericus</u>  <u>B. pasteurii</u> </p> <p>GRUPO III : Espora terminal esférica, deforma el esporangio.</p>

(Gutiérrez & Menéndez, 1980)

(Silva, 2013)

### 3.4 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *CLOSTRIDIUM*

Las bacterias del género *Clostridium* están ampliamente difundidas en la naturaleza, se pueden encontrar como parte de la microbiota normal del humano y varios animales más. El género incluye bacterias anaerobias estrictas, Gram positivas que se observan sin agrupación, en parejas o en cadenas cortas, forman endosporas que pueden tener forma oval o esférica. (Molina, 2015)

Debido a que son anaerobios y forman esporas resistentes al calor, sobreviven durante largos periodos en el suelo, en los desechos orgánicos, en agua, ríos y lagos, por lo tanto, son responsables de que en muchas ocasiones se estropeen alimentos, incluso enlatados. (Prescott, 2004)

Por lo general, las esporas de los clostridios son más amplias de diámetro que las de los bacilos a partir de los cuales se forman. La mayor parte de los bacilos del género son móviles y poseen flagelos peritricos. (Carroll, 2016)

Las especies de importancia médica son *C. perfringens* relacionado con infecciones en



Imagen 2. Frotis teñido con Gram de *Clostridium difficile*, hay abundantes esporas subterminales y “libres”. (Fordtran, 2006)

tejidos blandos y gangrena gaseosa.

*C. difficile* (Imagen 2) causa diarrea asociada al uso de antimicrobianos con colitis pseudomembranosa. *C. tetani* produce tétanos y *C. botulinum*, que produce intoxicaciones alimentarias, así como botulismo de recién nacido e infecciones de tejidos blandos.

(Molina, 2015)

### **3.5. MEDIOS DE CULTIVO**

Gran parte de los estudios en microbiología depende de la capacidad de cultivar y mantener microorganismos en un laboratorio, y esto es sólo posible si se dispone de medios de cultivo adecuados. Un medio de cultivo es una preparación líquida, sólida o semisólida utilizada para el crecimiento, transporte o mantenimiento de microorganismos. (Prescott, 2004)

Si se desea utilizar para el crecimiento, deberá contener todos los nutrientes esenciales para el microorganismo en concreto; Aunque todos los microorganismos necesitan fuentes de energía, la composición del medio dependerá de la especie que se desea obtener porque las necesidades nutricionales varían considerablemente.

Los medios de cultivo se pueden clasificar con base en distintos criterios, dentro de los cuales uno de los más importantes es según su función/uso; Un medio mínimo es aquel que contiene la cantidad mínima de nutrientes necesarios para que haya crecimiento bacteriano, normalmente sin presencia de aminoácidos o con muy pocos. (Arumí, 2023)

En contraste, los medios enriquecidos son aquellos que contienen los nutrientes necesarios y además se añaden ciertos elementos como sangre, suero, huevo, glucosa, vitaminas, entre otros, para permitir el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. (Soto, 2019)

En el primer cultivo a partir de una muestra, se selecciona una o varias colonias de interés para aislarlas y purificarlas sembrándolas en un medio de cultivo nuevo. La morfología colonial y los cambios en el medio de cultivo son tomados en cuenta para la realización de las pruebas posteriores. (Villalba, 2017)

#### **3.5.1. Agar Nutritivo**

Es un medio no selectivo usado ampliamente en bacteriología para el cultivo de casi todos los microorganismos, contiene una gran cantidad de nutrientes y por lo general se emplea para hacer un recuento de la microbiota total o para transferir y conservar los microorganismos que se han purificado. (Castillo, 2012)

Está formado por peptona, extracto de carne bovina y agar. El extracto de carne contiene sustancias solubles en agua, incluidos los carbohidratos, vitaminas,

compuestos de nitrógeno orgánicos y sales. Las peptonas son la fuente principal de nitrógeno orgánico, en particular aminoácidos y péptidos de cadena larga. El agar es el agente solidificante. (BD, 2014)

Una vez terminado el proceso de preparación del medio, queda de color ámbar claro como se muestra a continuación:

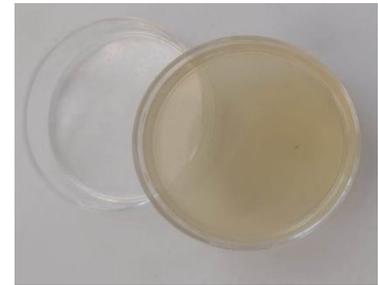


Imagen 3. Agar Nutritivo sin inocular preparado en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FESC.

### 3.5.2. Agar Sangre

Los medios diferenciales son medios que, como su nombre lo dice, diferencian entre grupos distintos de bacterias e incluso permiten una identificación tentativa de los microorganismos, según sus características biológicas. Por lo tanto, el agar sangre (Imagen 4) es un medio diferencial enriquecido. Sirve para diferenciar entre bacterias



Imagen 4. Agar Sangre sin inocular preparado en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FESC.

hemolíticas y no hemolíticas. (Prescott, 2004)

La infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. (Britania, 2021)

La sangre de carnero permite detectar reacciones hemolíticas como se mencionaba y aporta el factor X (hemo) necesario para el crecimiento de numerosas especies patógenas. En este medio, las colonias suelen ser más grandes y el crecimiento más profuso. (BD, 2013)

Las reacciones en el medio que se pueden observar son:

**Hemólisis alfa:** lisis parcial de los glóbulos rojos. Se observa un halo de color verdoso alrededor de la colonia en estudio. Es debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (compuesto de color verdoso) por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos. (Britania, 2021)

**Hemólisis beta:** lisis total de los glóbulos rojos. Se observa un halo claro, brillante alrededor de la colonia en estudio. (Britania, 2021)

**Hemólisis gamma:** ausencia de lisis de los glóbulos rojos. El medio de cultivo no presenta modificaciones de color y aspecto alrededor de la colonia en estudio. (Britania, 2021)

En los manuales de diagnóstico se recomienda el agar sangre como un medio de aislamiento primario, en muchos países se ha convertido en el medio de aislamiento primario más frecuentemente utilizado para las muestras clínicas. (BD, 2013)

### 3.5.3. Medio Cooked Meat

En 1916, Robertson desarrolló un medio de carne cocida para su uso en el cultivo de determinados organismos anaerobios aislados de heridas. (BD, 2015)

Cooked Meat Medium se utiliza para el cultivo y mantenimiento de clostridios y para la determinación de la actividad de organismos anaerobios proteolíticos. Favorece el crecimiento de la mayoría de los organismos anaerobios obligados formadores y no formadores de esporas. (BD, 2015)

Los grupos de sulfhidrilo, que ejercen un efecto de reducción, están más disponibles en la proteína desnaturizada, por consiguiente, las partículas de carne se cocinan para su uso. (BD, 2015)



Imagen 5. Medios Cooked Meat sin inocular preparados en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FESC.

Las peptonas son hidrolizados de proteínas obtenidos de la digestión proteolítica parcial de carne, caseína, harina de soya, gelatina, etc. Sirven como fuente de carbono, energía y nitrógeno. El extracto de carne contiene aminoácidos, péptidos, nucleótidos, ácidos orgánicos, vitaminas y minerales. (Prescott, 2004)

El tubo sin inocular se observa en la imagen 5; Una vez inoculados los tubos deben examinarse en un máximo de 7 días para determinar si hay crecimiento, digestión de carne, oscurecimiento y producción de gas. Deben realizarse tinciones de Gram y tinciones de esporas para determinar la forma y ubicación de las esporas. (BD, 2015)

#### **3.5.4. Sustrato alternativo: croqueta de alimento para perro marca Ganador®**

De acuerdo con Amascota, sección del Consejo Nacional de Fabricantes de Alimentos Balanceados y de la Nutrición Animal, A.C. (CONAFAB), las empresas productoras de alimentos para perro y gato deben contar con los elementos:

**Vitaminas:** Estas deben ser como la A, D, E y K, así como la B y C, y que aportan los nutrientes esenciales para el buen funcionamiento de los órganos de los perritos.

**Minerales:** Como el Ca, K, P, He, favoreciendo la absorción de algunas vitaminas y brindando un óptimo desarrollo en el crecimiento y protección de los huesos y dientes.

**Carbohidratos:** Son los principales factores en brindar energía, al igual de favorecer el tránsito y equilibrio intestinal.

**Grasas:** Pueden ser saturadas o insaturadas y también brindan energía.

**Proteínas:** Son indispensables para el desarrollo, crecimiento, gestación y lactancia. (Pruneda, 2023)

#### **3.5.5. Sustrato alternativo: croqueta de alimento para gato marca Gatina®**

Existen diferentes tipos de croquetas para gatos según su actividad física, el estilo de vida que lleven y las necesidades nutrimentales de la etapa del crecimiento que estén atravesando. Un estudio realizado por PROFECO avaló varios alimentos como los más recomendables para gatos, dentro de ellos se encuentra la marca Gatina.

Gatina cumple con la información de ingredientes y nutrimental de su etiqueta en un 95%, razón también por la que fue elegido como sustrato alternativo. (Rocha, 2021)

#### **3.5.6. Sustrato alternativo: Knorr® Suiza (Caldo de pollo en polvo)**

De acuerdo con el sitio oficial (Unilever, 2022), el caldo de pollo Knorr® Suiza es un alimento completo, ideal para sazonar todos los platillos porque tiene el balance de ingredientes necesario entre proteínas, grasas y carbohidratos.

Los sustratos elegidos tienen una composición muy semejante al medio cooked meat los cuales se resumen a continuación en el cuadro 2.

### 3.5.7 Información nutrimental de los sustratos y el medio cooked meat

Cuadro 2. Comparación de los nutrientes presentes en cada sustrato y el medio cooked meat.

Cooked meat	Gramos Por Litro	Croqueta para perro marca Ganador	Croqueta		Gramos Por Litro	Knorr Suiza (Caldo de pollo en polvo)	Gramos por Litro
			Gramos Por Litro	para gato marca Gatina			
<b>Gránulos de tejido cardiaco (Proteínas)</b>	<b>98 g</b>	Concentrado de proteína	<b>95 g</b>	Proteína cruda	<b>86 g</b>	Proteína	<b>7 g</b>
<b>Digerido péptico de tejido animal</b>	<b>20 g</b>	Grasa cruda	<b>4g</b>	Grasa cruda	<b>3 g</b>	Carbohidratos	<b>25 g</b>
<b>Dextrosa</b>	<b>2 g</b>	Fibra cruda	<b>13 g</b>	Fibra cruda	<b>16 g</b>	Grasa	<b>11 g</b>
<b>Cloruro sódico</b>	<b>5 g</b>	Minerales	<b>3 g</b>	Minerales	<b>3g</b>		
		Cloruro de sodio	<b>6 g</b>	Cloruro de sodio	<b>6 g</b>		

### **3.6. PRUEBAS PRIMARIAS DE IDENTIFICACION**

El laboratorio de microbiología clínica puede proporcionar una identificación preliminar o definitiva de los microorganismos basándose en:

1. Examen microscópico
2. Estudio del cultivo y características bioquímicas
3. Pruebas inmunológicas
4. Tipificación con bacteriófagos
5. Métodos moleculares (Prescott, 2002)

La clasificación taxonómica tiene como objetivo describir y diferenciar la gran diversidad de especies bacterianas, agrupándolas según sus similitudes.

Las bacterias se pueden clasificar con base en diversos criterios que fueron mencionados anteriormente, no obstante, el conocimiento de la composición bioquímica de las diferentes estructuras de las bacterias, así como de su metabolismo es primordial para una correcta identificación. (Molina, 2015)

Las pruebas bioquímicas primarias, como su nombre lo dice, nos ayudan a identificar primeramente géneros con base en características morfológicas y metabólicas básicas de los microorganismos. (Tortora, 2017)

Estas pruebas bioquímicas primarias son:

#### **3.6.1. Tinción de Gram**

Un hito en la bacteriología fue la tinción desarrollada por el médico danés Hans Christian Gram en 1884, que implementó la técnica de tinción que lleva su nombre, y consiste en teñir a las bacterias con colorantes específicos, actualmente es el método de tinción más ampliamente utilizado en bacteriología. (Molina, 2015)

En la siguiente imagen se resumen los pasos de la tinción de Gram:



Imagen 6. Procedimiento de la tinción de Gram. (Carroll, 2016)

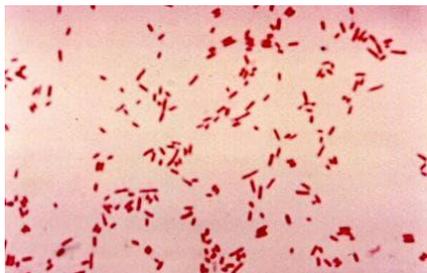


Imagen 7. Tinción de Gram para *E. coli* (MD, 2019)

Si bien las esporas no se visualizan con facilidad en todos los frotis, su presencia confirma la identificación del género. Las esporas intracelulares y libres no se tiñen con esta técnica. (Tamez, 2013)

microscopio debe correlacionarse con las características morfológicas de las cepas aisladas en medios de cultivo.

Las especies de *Bacillus* y *Clostridium* son Gram positivos (Imagen 8)

cuando se tiñen a partir de cultivos jóvenes y una de



Imagen 8. Tinción de Gram para *B. subtilis* (Microbe, 2023)

Finalmente se observan al microscopio óptico, distinguiendo dos tipos de bacterias teñidas. (Molina, 2015)

Esta tinción es un método diferencial porque divide a las bacterias en Gram negativas (Imagen 7) y Gram positivas (Imagen 8); Se fundamenta en la composición de la pared celular, específicamente la cantidad de peptidoglucano.

Una parte importante de esta tinción es que lo observado al

### 3.6.2. Catalasa

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en  $H_2O$  y  $O_2$ . La prueba se utiliza para comprobar la presencia de la enzima, que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas.

La producción rápida de burbujas (efervescencia) cuando una colonia del cultivo bacteriano se mezcla con una gota de solución de peróxido de hidrógeno se interpreta



Imagen 9. Catalasa positivo; Tomada por Nicole Danaé Ávila Basurto en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FESC.

como una prueba positiva como se muestra en la imagen 9. (Villalba, 2017)

Con esta prueba podemos diferenciar *Bacillus* de *Clostridium*, *Bacillus* es catalasa (+) mientras que *Clostridium* es catalasa (-). (Fernández, 2010)

### 3.6.3 Oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de la enzima oxidasa. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. (Fernández, 2010)



Imagen 10. Prueba de oxidasa (Villalba, 2017)

El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa solo se encuentra en las bacterias aerobias y algunas anaerobias facultativas. (Fernández, 2010)

Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que esta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica. (Fernández, 2010)

### 3.6.4. Motilidad

Su utilidad es determinar si un organismo tiene motilidad o no. Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos.

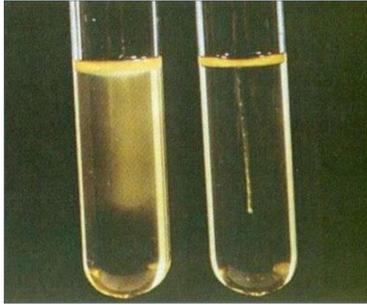


Imagen 11. Motilidad en medio SIM  
Izquierda: Motilidad positiva  
Derecha: Motilidad negativa  
(Villalba, 2017)

La motilidad desempeña un papel importante en la supervivencia y la capacidad de ciertas bacterias de causar enfermedad. Ésta prueba puede llevarse a cabo en medios como OF, SIM o MIO, donde se debe observar un crecimiento turbio lejos de la picadura recta realizada en la inoculación como se observa en la imagen 11.

Para esta prueba, también se puede utilizar la técnica de gota suspendida, la cual consiste en colocar una gota de solución salina fisiológica con el inóculo sobre un cubreobjetos, colocarlo en un portaobjetos sin tocarse y evaluar la motilidad. (Villalba, 2017)

Dentro del género *Bacillus*, nos permite diferenciar el género *B. anthracis* (-) de otras especies generalmente (+).

### 3.6.5. Oxidación/Fermentación

La forma en que un microorganismo metaboliza un carbohidrato se determina mediante la observación de los subproductos ácidos que produce en presencia o ausencia de oxígeno. El microorganismo que se desea identificar se siembra en dos tubos OF, uno de los cuales se cubre con aceite para impedir el ingreso de oxígeno. (Villalba, 2017)

El medio contiene proteínas, un solo hidrato de carbono (glucosa en este caso) y azul de bromotimol como indicador de pH. Las bacterias que se inoculen en el interior del tubo y puedan utilizar las proteínas o el hidrato de carbono como fuentes de carbono y energía producirán ácidos y el indicador de pH virará.

Para producir energía a partir de glucosa, los microorganismos utilizan dos procesos generales: respiración y fermentación. Ambos suelen comenzar con la glucólisis, pero después siguen distintas vías, según la disponibilidad de oxígeno. (Tortora, 2017)

Utilización del carbohidrato	Tubo Abierto (sin capa de aceite)	Tubo Cerrado (con capa de aceite)
Oxidación (O)	Positivo (amarillo)	Negativo (verde)
Fermentación facultativa (O+ F+)	Positivo (amarillo)	Positivo (amarillo)
Fermentación estricta (O- F+)	Negativo (verde)	Positivo (amarillo)
No oxidador/No Fermentador (NR)	Negativo (verde)	Negativo (verde)



Imagen 12. Interpretación de la prueba de O/F. (Villalba, 2017)

### 3.7. PRUEBAS BIOQUÍMICAS SECUNDARIAS DE IDENTIFICACIÓN

Posterior a la realización de las pruebas bioquímicas primarias, se pueden establecer las pruebas secundarias a realizar. Éstas son más específicas y podemos llegar a identificar la especie. (Villalba, 2017)

Los microorganismos poseen un metabolismo celular que se lleva a cabo por catalizadores biológicos conocidos como enzimas, que son expresadas por el material genético de cada especie, aunque existen variaciones en la expresión de estas enzimas dentro de una misma especie, se puede utilizar esta información para realizar un perfil bioquímico del microorganismo. (Villalba, 2017)

Entre las pruebas secundarias más comunes y que más información aportan para la identificación de *Bacillus* y *Clostridium* son:

#### 3.7.1. Citratos

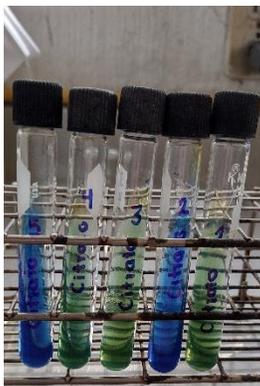


Imagen 13 Prueba citratos. Imagen tomada en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FESC por Nicole Danaé Ávila Basurto.

El citrato de Simmons es un medio sintético que incorpora citrato como única fuente de carbono en el medio. En las bacterias, el desdoblamiento del citrato comprende un sistema enzimático sin la intervención de la coenzima A, la enzima se denomina citritasa o citrato desmolasa. (García, 1998)

El medio contiene citrato de sodio y fosfato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, y azul de bromotimol como indicador de pH. Finalmente, el color del medio es verde, por lo tanto, las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones amonio lo que, junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte alcalinización del medio que será evidente por

un cambio de color del indicador de pH, de verde a azul como se observa en la imagen 13. (ULPGC, 2022)

### 3.7.2. Nitratos

Sirve para determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno molecular. (Fernández, 2010)

El medio es un caldo y se debe sembrar con inóculo pesado, se debe incubar 37°C hasta por 48hrs. Después de la incubación, se añaden tres gotas de ácido sulfanílico y otras tres de  $\alpha$ -naftilamina, se mezcla y el medio tiene que virar a rojo y mantenerse unos tres minutos así, lo que indicaría reducción a nitritos y por lo tanto una prueba positiva.

Si no aparece color después de la adición de reactivos, se debe agregar un poco de Zinc (Zn) en polvo. Si el medio vira a rojo se considera como prueba negativa, ya que el zinc es el que está reduciendo los  $\text{NO}_3$ . Si no hay coloración, es positiva la prueba e indica que se redujo hasta nitrógeno molecular.

Los resultados anteriores los podemos observar resumidos en la imagen 14.



Imagen 14. Prueba nitratos. Imagen tomada en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FESC por Nicole Danaé Ávila Basurto.

### 3.7.3. Rojo de Metilo (RM) – Voges Proskauer (VP)

Las bacterias anaerobias facultativas utilizan la glucosa en dos fases: primero la metabolizan aeróbicamente consumiendo rápidamente el oxígeno del medio, para, en segundo lugar, continuar metabolizando por vía anaerobia (fermentación) la cual puede ser de dos tipos:

**1. Fermentación ácido-mixta:** tiene como productos finales ácidos orgánicos (ácido fórmico, láctico, acético y succínico) que puede detectarse por el viraje del indicador rojo de metilo que permanece amarillo por encima de  $\text{pH}=5.1$  y rojo por debajo de 4.4 como se muestra en la imagen 15. (ULPGC, 2022)

Mediante esta prueba se comprueba la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa. Se utiliza como parte de la identificación a nivel de especie de los bacilos entéricos Gram negativos. (Fernández, 2010)

**2. Fermentación butanodiólica:** Los productos finales son compuestos neutros como el butanodiol y el etanol, produciéndose acetoina como intermediario que podrá ser detectada añadiendo al medio KOH al 40% y  $\alpha$ -naftol que reaccionarán produciendo un anillo rojo como se observa en la imagen 16. (ULPGC, 2022)

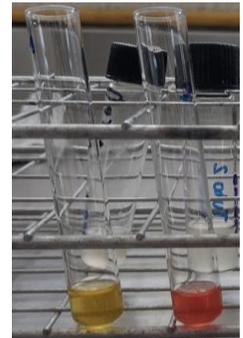


Imagen 15.  
Prueba RM.  
Amarillo: RM -,  
Rojo: RM: +  
Fotografía  
tomada en el  
laboratorio 10 del  
edificio de  
posgrado e  
investigación de  
la FESC.

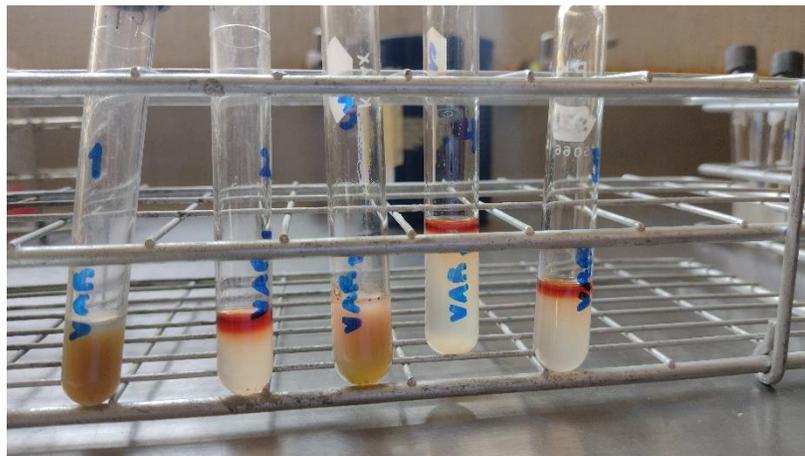


Imagen 16. Prueba VP. Fotografía tomada en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FESC por Nicole Danaé Ávila Basurto.

### 3.7.4. Hidrólisis de gelatina

Esta prueba muestra la capacidad de ciertos microorganismos para hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos, mediante la acción de enzimas específicas denominadas gelatinasas. (Fernández, 2010)



Imagen 17. Hidrólisis de gelatina.  
(Gómez, 2019)

El medio se inocula por picadura, se incuba 24hrs a 37°C y posteriormente se debe meter 5 minutos al refrigerador para comprobar que la capacidad enzimática de licuefacción de las bacterias es positiva como se observa en la imagen 17.

### 3.7.5. Hidrólisis de caseína

Las placas de agar con leche descremada se utilizan para proporcionar un medio nutritivo para el crecimiento de microorganismos. Una vez preparado, se puede evaluar la capacidad del microorganismo para digerir la proteína caseína que es una gran proteína insoluble. (Science, 2022)

El medio detecta la presencia de caseínasa, una enzima capaz de hidrolizar la proteína láctea caseína en pequeños aminoácidos y péptidos. Las bacterias que utilizan caseína aparecen como colonias rodeadas de una zona transparente como se observa en la imagen 18 revelada con lugol. (Prescott, 2002)



Imagen 18. Hidrólisis de caseína.  
Fotografía tomada en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FESC.

### 3.7.6. Prueba de Lecitina

Pone de manifiesto la producción de la enzima lecitinasa por determinados microorganismos, capaces de actuar sobre la lecitina, sustancia orgánica nitrogenada y fosfatada, contenida principalmente en la yema de huevo. (Fernández, 2010)

Se debe realizar una estría sobre el medio e incubar de 1 a 4 días a la temperatura óptima de crecimiento del



Imagen 19. Prueba de Lecitina. Fotografía tomada en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FESC.

microorganismo. Una prueba positiva consiste en la aparición de una zona opaca alrededor del crecimiento microbiano (Imagen 19), como resultado de la hidrólisis de la lecitina presente en la yema de huevo.

### 3.8. TINCIÓN DE ESPORAS

Aunque los microorganismos vivos se pueden examinar directamente con un microscopio óptico, a menudo hay que fijarlos y teñirlos para aumentar su resolución, acentuar las características morfológicas y conservarlos para su estudio en el futuro. (Prescott, 2004)

#### 3.8.1. Tinción Schaeffer-Fulton

En 1922, se publica el primer método para la tinción de endosporas bacterianas. Esta

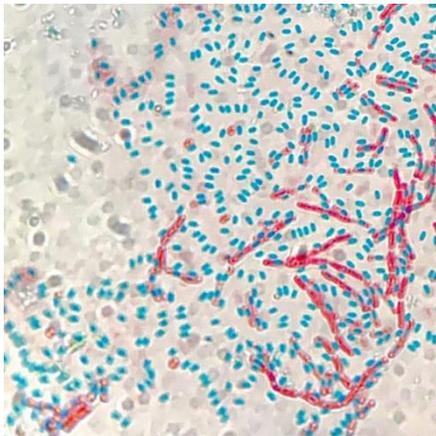


Imagen 20. Tinción de Schaeffer-Fulton 1000x para *B. megaterium*. (Anton, 2020)

técnica empleaba una etapa prolongada de calentamiento, lo que dio como resultado una tinción diferencial entre endosporas y células vegetativas en la misma muestra, mostrando tanto endosporas como esporas libres, que aparecían de color verde o azul, en contraste con el tinte rojo obtenido por las células vegetativas (Imagen 20) . (Domínguez, 2013)

Durante muchos años, sólo identificar la presencia de endosporas o esporas libres resultaba suficiente. Frecuentemente, la refractibilidad de las esporas se puso de manifiesto por medio de tinción simple o tinción de Gram y la caracterización e identificación del organismo podía realizarse con otros criterios. (Domínguez, 2013)

Como las endosporas son impermeables a la mayoría de los colorantes, se han utilizado tinciones especiales con el propósito de observarlas mejor; la tinción de esporas bacterianas, también llamada tinción Schaeffer-Fulton, es utilizada ampliamente para la identificación de bacterias esporuladas, generalmente pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. (Domínguez, 2013)

El método de Schaeffer y Fulton modificó el método de Dorner en 1933, con el propósito de hacer el proceso más rápido, pero el calentamiento con un mechero Bunsen todavía resultaba ser un problema. (Domínguez, 2013)

Con esta tinción se observa la posición de la endospora en la célula madre, difiere frecuentemente según la especie, teniendo por ello un valor considerable en la identificación. Las endosporas pueden estar situadas centralmente, cerca de un extremo (subterminal) o claramente terminales como se muestra en la imagen 21:

En la actualidad, la tinción de esporas bacterianas se realiza utilizando verde de malaquita (VM) a una concentración de 10% (p/V) y safranina a una concentración de 0.5% (p/V). Sin embargo, debido a su resistencia característica, en muchos casos las endosporas requieren ser observadas en cultivos de 48 horas o posteriores, obstaculizando la apreciación de estas al microscopio. (Domínguez, 2013)

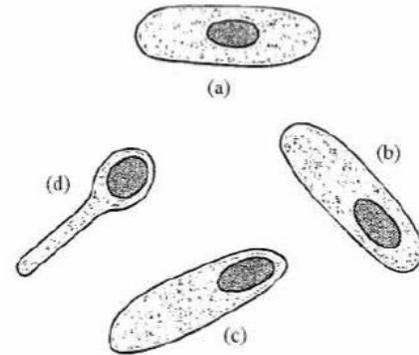


Imagen 21. Ejemplos de localización y tamaño de endosporas.

- a) Endospora central
- b) Endospora subterminal
- c) Endospora terminal
- d) Endospora terminal con esporangio hinchado

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general:**

Elaborar medios de cultivo semejantes al medio cooked meat como alternativa para la obtención de bacterias esporuladas en las prácticas de bacteriología y microbiología de la FESC.

### **4.2. Objetivos particulares:**

- Identificar sustratos útiles como alternativa al uso del medio cooked meat.
- Preparar los medios de cultivo alternativos.
- Evaluar la funcionalidad de los medios de cultivo alternativos mediante la obtención de bacterias esporuladas.
- Identificar las bacterias esporuladas obtenidas.

## **5. HIPÓTESIS**

Al utilizar medios de cultivo con sustratos y preparación similares al medio de cultivo cooked meet se obtendrán bacterias esporuladas que servirán para realizar prácticas académicas en el área de bacteriología y microbiología de la FES-C.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Listado de material, reactivos, sustancias, aparatos y equipos.

#### 6.1.1 Medios de cultivo.

Cantidad	Nombre
1 frasco	Medio de cultivo deshidratado Agar - Agar
1 frasco	Medio de cultivo deshidratado base Agar Nutritivo
1 frasco	Medio de cultivo deshidratado base Agar Sangre
1 frasco	Medio de cultivo deshidratado base O/F
1 frasco	Medio de cultivo deshidratado base nitratos
1 frasco	Medio de cultivo deshidratado base citratos
1 frasco	Medio de cultivo deshidratado base MR-VP
1 frasco	Medio de cultivo deshidratado base gelatina
1.5 g	1.5 g de croquetas de alimento para perro marca Ganador®
1.5 g	1.5 g de croquetas de alimento para gato marca Gatina®
1.5 g	1.5 g de Knorr® Suiza (Caldo de pollo en polvo)
5 medios	Cooked meat

#### 6.1.2 Material de vidrio.

Cantidad	Nombre
140	Tubos de ensayo con tapón de rosca
1 a 5	Matraz Erlenmeyer de 125 mL con tapón de algodón
1 a 5	Matraz Erlenmeyer de 500 mL con tapón de algodón
1 caja	Portaobjetos
2	Cajas Petri de vidrio
1	Termómetro de mercurio
4	Probeta de 100mL
4	Pipeta graduada de 10mL

### 6.1.3 Sustancias y reactivos

<b>Cantidad</b>	<b>Nombre</b>
<b>1 botella</b>	Alcohol de 96°
<b>1 frasco</b>	Solución de sulfato de magnesio al 5%
<b>1 frasco</b>	Peróxido de hidrógeno al 3%
<b>1 tren</b>	Tinción de Gram: Cristal violeta, lugol, alcohol-acetona, safranina
<b>20 discos</b>	Impregnados con clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%
<b>1 tubo de ensayo</b>	Solución salina fisiológica
<b>1 tubo de ensayo</b>	Agua estéril
<b>1 frasco</b>	Ácido sulfanílico
<b>1 frasco</b>	$\alpha$ -naftilamina
<b>1 frasco</b>	Polvo de zinc
<b>1 frasco</b>	Rojo de metilo
<b>1 frasco</b>	$\alpha$ -naftol 5% y KOH al 40%
<b>1 frasco</b>	Lugol concentrado
<b>1 frasco</b>	Verde de malaquita al 10%
<b>1 frasco</b>	Aceite de inmersión
<b>1 frasco</b>	Aceite mineral
<b>1 bolsa de 250g</b>	Leche descremada en polvo
<b>1 frasco</b>	Peptona de caseína
<b>1 frasco</b>	Fosfato disódico
<b>1 frasco</b>	Cloruro de Sodio
<b>1 frasco</b>	Glucosa
<b>1 pieza</b>	Huevo
<b>6 tubos</b>	Con ETDA con 4mL de sangre O Rh+
<b>1 caja</b>	Tiras reactivas de pH

#### 6.1.4 Material general

Cantidad	Nombre
1 barra	Plastilina
5	Gradillas
1	Piseta con agua destilada
50	Cajas Petri chicas de plástico
1	Masking tape

#### 6.1.4 Aparatos y equipos

Cantidad	Nombre
1	Tripié
1	Propipeta
1	Balanza analítica
3	Asas bacteriológicas
1	Pinzas punta roma
1 frasco	Palillos punta de roma
1	Autoclave
1	Mechero de Bunsen
1	Tela de asbesto
1	Espátula
1	Baño María
1	Separador de claras
1	Estufa bacteriológica 37°C
1	Jeringa para insulina
1	Guantes para autoclave
1	Microscopio
1	Frasco con tierra obtenida de la FESC

## Procedimiento

### 6.2 Preparación de medios alternativos.

Se prepararán 5 tubos de cada medio alternativo seleccionado.

- Rotular 5 tubos de ensayo como 1 Var<sub>1</sub>, 2 Var<sub>1</sub>, 3 Var<sub>1</sub>, 4 Var<sub>1</sub>, 5 Var<sub>1</sub>,
- Pesar 1.5 g de croquetas de alimento para perro (5 croquetas aproximadamente) marca ganador en la balanza analítica.
- Añadir las croquetas a los tubos de ensayo con las pinzas punta de roma hasta el fondo del tubo.
- Agregar 3.5 mL de agua destilada con la piseta
- Esterilizar los tubos en el autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Sacar los tubos del autoclave y añadir con la espátula tierra obtenida de la FESC 0.5 cm arriba de la superficie de las croquetas con el agua destilada
- Colocar la tela de asbesto sobre el tripié, encima de éstos el recipiente para el baño María y debajo el mechero de Bunsen.
- Encender el mechero por 10 minutos para estresar a las bacterias.
- Una vez terminado el tiempo, tomar con el guante o con las pinzas los tubos y resguardarlos a temperatura ambiente, protegidos de la luz y cerrados por 6 días.

Repetir el procedimiento anterior para la Variante<sub>2</sub> (Croqueta de alimento para gato) y para la Variante<sub>3</sub> (Caldo de pollo en polvo). Para los tubos con medio cooked meat únicamente se rotularán como CM 1, CM 2, CM 3, CM 4 y CM 5, se inocularán con la misma cantidad de tierra, se pondrán a baño María y se resguardarán en las mismas condiciones.

### 6.3 Preparación de los medios de cultivo

#### 6.3.1 Agar Sangre

- Leer la etiqueta del frasco del medio deshidratado para realizar los cálculos para preparar 20 cajas Petri chicas y excedente.
- Pesar en la balanza analítica 17.6 g de medio de cultivo deshidratado base agar sangre.
- Medir 220 mL de agua destilada en la probeta graduada.

- Añadir al matraz Erlenmeyer de 500 mL el agua destilada y el polvo, disolver con movimientos circulares y posteriormente añadir los 220 mL de agua destilada restantes.
- Colocar la tela de asbesto sobre el tripié para montar sobre ellos el matraz Erlenmeyer con su tapón de algodón.
- Encender el mechero de Bunsen y clarificar el medio llevándolo hasta ebullición en agitación constante para evitar derrames.
- Meter al autoclave a 121°C por 15 minutos para su esterilización.
- Cuando termine la esterilización, medir la temperatura y esperar que se enfríe 50°C, en ese momento, añadir los 22 mL de sangre anticoagulada con la pipeta graduada casi hasta el fondo sin tocar el medio, homogeneizando el matraz.
- Servir aproximadamente 20 mL por caja, cuando el medio haya gelificado, guardar los cajas rotuladas correctamente en el refrigerador para su uso posterior.

### 6.3.2 Agar Nutritivo

- Leer la etiqueta del frasco del medio deshidratado para realizar los cálculos para preparar 20 cajas Petri chicas y excedente.
- Pesar en la balanza analítica 8.4 g de medio de cultivo deshidratado base agar nutritivo.
- Medir 200 mL de agua destilada en la probeta graduada.
- Añadir al matraz Erlenmeyer de 500 mL el agua destilada y el polvo, disolver con movimientos circulares y posteriormente añadir los 160 mL de agua destilada restantes.
- Colocar la tela de asbesto sobre el tripié para montar sobre ellos el matraz Erlenmeyer con su tapón de algodón.
- Encender el mechero de Bunsen y clarificar el medio llevándolo hasta ebullición en agitación constante para evitar derrames.
- Meter al autoclave a 121°C por 15 minutos para su esterilización.
- Cuando termine la esterilización, medir la temperatura y esperar que se enfríe a 45-50°C para poder manipularlo y servirlo en cajas.

- Una vez servido y cuando los medios hayan gelificado, guardar las cajas rotuladas correctamente en el refrigerador para su uso posterior.

### 6.3.3 Agar Caseína

- Rotular las cajas y realizar los cálculos para preparar 20 cajas Petri chicas y excedente.
- Pesar en la balanza analítica 20.0 g de leche descremada en polvo.
- Medir 200 mL de agua destilada en la probeta graduada.
- Añadir al matraz Erlenmeyer de 500 mL el agua destilada y el polvo, mezclar y añadir 10.0 g de Agar-Agar.
- Añadir los 50 mL de agua destilada restantes y disolver con movimientos circulares.
- Colocar la tela de asbesto sobre el tripié para montar sobre ellos el matraz Erlenmeyer con su tapón de algodón.
- Encender el mechero de Bunsen y clarificar el medio llevándolo hasta ebullición en agitación constante para evitar derrames.
- Meter al autoclave a 121°C por 15 minutos para su esterilización.
- Medir la temperatura y esperar que se enfríe a 45-50°C para poder manipularlo y servirlo en cajas.
- Cuando los medios hayan gelificado, guardar las cajas rotuladas correctamente en el refrigerador para su uso posterior.

### 6.3.4 Agar Lecitina

- Rotular las cajas y realizar los cálculos para preparar 20 cajas Petri chicas y excedente.
- Pesar en la balanza analítica 17.2 g de peptona de caseína
- Pesar en la balanza analítica 2.2 g de fosfato disódico
- Pesar en la balanza analítica 0.9 g de cloruro de sodio
- Pesar en la balanza analítica 10.8 g de Agar-Agar
- Añadir 300 mL de agua destilada al matraz Erlenmeyer, agregar los ingredientes anteriores y mezclar.

- Medir con una jeringa de insulina 0.09 mL de la solución de sulfato de magnesio al 5% y agregar a la mezcla anterior.
- Añadir los 132 mL de agua destilada restantes y disolver con movimientos circulares.
- Colocar la tela de asbesto sobre el tripié para montar sobre ellos el matraz Erlenmeyer con su tapón de algodón.
- Encender el mechero de Bunsen y clarificar el medio llevándolo hasta ebullición en agitación constante para evitar derrames.
- Pesar en la balanza analítica 0.9 g de glucosa y añadir al medio.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos, cuando termine la esterilización, medir la temperatura y esperar que se enfríe a 45-50°C, en ese momento medir el pH del medio el cual debe ser de 7.
- Mientras se enfría el medio, lavar con agua y jabón un huevo, enjuagar y desinfectar con alcohol de 96°. Separar la yema de la clara y añadir al medio (cuando éste ya tenga la temperatura adecuada).
- Homogeneizar el matraz Erlenmeyer con movimientos circulares y una vez que se vea bien homogeneizado servir en cajas Petri, dejar solidificar y mantener en refrigeración.

Nota: Se pueden preparar al mismo tiempo los medios de cultivo para esterilizarlos juntos, sin embargo, se recomienda preparar los medios caseína y lecitina unos días antes de usarlos para que no se contaminen.

## 6.4 Preparación de las pruebas bioquímicas

### 6.4.1 Oxidación/Fermentación

- Leer la etiqueta del frasco del medio deshidratado para realizar los cálculos para preparar 40 tubos y excedente.
- Pesar en la balanza analítica 1.0 g de medio de cultivo deshidratado base O/F
- Medir 50 mL de agua destilada en la probeta graduada.
- Añadir al matraz Erlenmeyer de 125 mL el agua destilada y el polvo, disolver con movimientos circulares y posteriormente añadir los 46 mL de agua destilada restantes.

- Colocar la tela de asbesto sobre el tripié para montar sobre ellos el matraz Erlenmeyer con su tapón de algodón.
- Encender el mechero de Bunsen y clarificar el medio llevándolo hasta ebullición en agitación constante para evitar derrames.
- Añadir 0.01 g de glucosa al medio, servir en tubos con ayuda de la pipeta graduada y tener cuidado de no derramar el medio, dejar el tapón de rosca flojo y posteriormente meter al autoclave a 110°C por 10 minutos para su esterilización.
- Sacar los tubos del autoclave y acomodarlos en una gradilla de forma vertical, cerrar bien los tapones, esperar a que se enfríen, rotularlos y resguardarlos en un lugar fresco a temperatura ambiente hasta el día de su uso.

#### 6.4.2 Citratos

- Leer la etiqueta del frasco del medio deshidratado para realizar los cálculos para preparar 20 tubos y excedente.
- Pesar en la balanza analítica 2.0 g de medio de cultivo deshidratado base agar citrato de Simmons.
- Medir 50 mL de agua destilada en la probeta graduada.
- Añadir al matraz Erlenmeyer de 125 mL el agua destilada y el polvo, disolver con movimientos circulares y posteriormente añadir los 22 mL de agua destilada restantes.
- Colocar la tela de asbesto sobre el tripié para montar sobre ellos el matraz Erlenmeyer con su tapón de algodón.
- Encender el mechero de Bunsen y clarificar el medio llevándolo hasta ebullición en agitación constante para evitar derrames.
- Rotular los tubos de ensayo y servir el medio con ayuda de la pipeta graduada teniendo cuidado de no derramar el medio, dejar el tapón de rosca flojo y preparar la siguiente prueba.

#### 6.4.3 Nitratos

- Leer la etiqueta del frasco del medio deshidratado para realizar los cálculos para preparar 20 tubos y excedente.

- Pesar en la balanza analítica 0.3 g de medio de cultivo deshidratado base caldo de nitratos
- Medir 20 mL de agua destilada en la probeta graduada.
- Añadir al matraz Erlenmeyer de 125 mL el agua destilada y el polvo, disolver con movimientos circulares y posteriormente añadir los 16 mL de agua destilada restantes.
- Colocar la tela de asbesto sobre el tripié para montar sobre ellos el matraz Erlenmeyer con su tapón de algodón.
- Encender el mechero de Bunsen y clarificar el medio llevándolo hasta ebullición en agitación constante para evitar derrames.
- Rotular los tubos de ensayo y servir el medio con ayuda de la pipeta graduada teniendo cuidado de no derramar el medio, dejar el tapón de rosca flojo y preparar la siguiente prueba.

#### 6.4.4 Rojo de Metilo (RM) – Voges Proskauer (VP)

- Leer la etiqueta del frasco del medio deshidratado para realizar los cálculos para preparar 20 tubos y excedente.
- Pesar en la balanza analítica 1.2 g de medio de cultivo deshidratado base MR-VP.
- Medir 50 mL de agua destilada en la probeta graduada.
- Añadir al matraz de 125 mL el agua destilada y el polvo, disolver con movimientos circulares y posteriormente añadir los 22 mL de agua destilada restantes.
- Colocar la tela de asbesto sobre el tripié para montar sobre ellos el matraz Erlenmeyer con su tapón de algodón.
- Encender el mechero de Bunsen y clarificar el medio llevándolo hasta ebullición en agitación constante para evitar derrames.
- Rotular los tubos de ensayo y servir el medio con ayuda de la pipeta graduada teniendo cuidado de no derramar el medio, dejar el tapón de rosca flojo y preparar la siguiente prueba.

#### 6.4.5 Gelatina

- Leer la etiqueta del frasco del medio deshidratado para realizar los cálculos para preparar 20 tubos y excedente.
- Pesar en la balanza analítica 9.2 g de medio de cultivo deshidratado base gelatina.
- Medir 50 mL de agua destilada en la probeta graduada.
- Añadir al matraz de 125 mL el agua destilada y el polvo, disolver con movimientos circulares y posteriormente añadir los 22 mL de agua destilada restantes.
- Colocar la tela de asbesto sobre el tripié para montar sobre ellos el matraz Erlenmeyer con su tapón de algodón.
- Encender el mechero de Bunsen y clarificar el medio llevándolo hasta ebullición en agitación constante para evitar derrames.
- Rotular los tubos de ensayo y servir el medio con ayuda de la pipeta graduada teniendo cuidado de no derramar el medio, dejar el tapón de rosca flojo.

Nota: Cuando ya se prepararon los medios: citratos, nitratos, MR-VP y gelatina se introducirán en el autoclave a 121°C por 15 minutos para su esterilización. Pasado ese tiempo, se sacarán con mucho cuidado y se organizarán de la siguiente forma:

Citratos: se dejan solidificar de forma inclinada para generar una zona aerobia y una anaerobia dentro del tubo y cerrando bien el tapón.

Nitratos y MR-VP: Ambos son caldos, por lo tanto, se dejan acomodados en sus respectivas gradillas de forma vertical para que se enfríen, se cierra bien el tapón de cada tubo.

Gelatina: Se deja solidificar el medio en su gradilla de forma vertical con su tapón bien cerrado.

Todos los tubos pueden quedarse en la mesa de trabajo para que se enfríen y se pueden recoger al día siguiente para guardarlos hasta su uso.

## 6.5 Aislamiento en agar sangre

- Rotular las cajas con la misma leyenda que los tubos de la Variante<sub>1</sub>
- Esterilizar el asa calibrada de 10 $\mu$ L y dejarla enfriar
- Tomar el tubo 1 de la Variante<sub>1</sub> que contiene la muestra, retirar la tapa del tubo, flamear la boca del tubo en el mechero
- Introducir el asa en el fondo del tubo sin tocar las paredes y tomar un poco de suspensión
- Flamear nuevamente la boca del tubo, taparlo y dejarlo en una gradilla
- Transferir el inóculo al agar sangre, realizando la técnica de sembrado masivo
- Esterilizar el asa después de usarla
- Incubar la caja invertida 37°C de 24-48 hrs.
- Después de transcurrido ese tiempo, observar el crecimiento obtenido

Nota: Repetir el procedimiento anterior con los tubos restantes de la Var<sub>1</sub> y posteriormente los de Var<sub>2</sub>, Var<sub>3</sub> y los tubos del medio cooked meat. Si el desarrollo bacteriano es óptimo, conservar los aislados dos días en lo que se desarrollan en el agar nutritivo.

## 6.6 Purificación en agar nutritivo

- Revisar el crecimiento en el agar sangre a las 24 y 48 hrs, si el crecimiento es óptimo se procede a purificar una colonia
- Rotular las cajas de la misma manera que en el punto 6.5.
- Esterilizar el asa de 1  $\mu$ L y dejarla enfriar.
- Seleccionar una colonia bacteriana y tocarla con el asa para tomar el inóculo.
- Transferir el inóculo al agar nutritivo, realizando la técnica de sembrado dilución americana
- Esterilizar el asa después de usarla.
- Incubar la caja invertida 37°C de 24-48 hrs.
- Después de transcurrido ese tiempo, observar el crecimiento obtenido

Nota: Si el crecimiento bacteriano en el agar nutritivo de todos los aislados es satisfactorio a las 48hrs, desechar las cajas de agar sangre inactivándolas en autoclave a 121°C por 20min y posteriormente a la basura municipal.

## 6.7 Realización de las pruebas bioquímicas primarias y tinciones

### 6.7.1 Tinción de Gram

- Flamear el asa , tomar una gota de agua estéril y colocar en el centro de un portaobjetos previamente rotulado.
- Flamear nuevamente el asa y enfriar, tomar una colonia aislada y no tan grande el agar nutritivo, mezclar con movimientos circulares.
- Dejar secar al aire y fijar al mechero e ir preparando los demás Gram de las demás cajas
- Una vez listas las laminillas de las 5 cajas de cada variante y del medio cooked meat colocar en el tren de tinción
- Cubrir con cristal violeta por 1 min y enjuagar suavemente
- Cubrir con lugol 1 min y enjuagar con agua
- Decolorar con alcohol-acetona por 5-10s segundos y enjuagar con agua
- Cubrir con safranina por 1 min y enjuagar
- Dejar secar y observar al microscopio con los objetivos de 40x y 100x.
- Registrar resultados en la tabla correspondiente

### 6.7.2 Catalasa

- Usar un portaobjetos por variante y rotular cinco espacios como 1, 2, 3, 4 y 5 para cada variante y el medio cooked meat
- Con un asa estéril, tomar una colonia del agar nutritivo y colocarla directamente en el portaobjetos.
- Añadir una gota de peróxido de hidrógeno sobre las preparaciones.
- Observar la aparición o no de burbujas y registrar resultados.

### 6.7.3 Oxidasa

- Colocar en orden y sobre un fondo previamente rotulado los discos impregnados con clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%
- Utilizar palillos de madera punta roma estériles para tomar una colonia y frotarla en su disco correspondiente.
- Observar la reacción y cambio de coloración (si es que hay) y registrar resultados

- Desechar los palillos y el papel en el frasco con desinfectante

#### 6.7.4 Motilidad

- Colocar una gota de solución salina fisiológica en un cubreobjetos
- Tomar un inóculo pequeño con el asa y homogeneizar sin extender tanto
- Colocar el cubreobjetos con la gota hacia abajo encima de un portaobjetos con 4 bolitas de plastilina para evitar el contacto
- Observar al menos 5 a 10 bacterias recorrer todo el campo de visión para declarar motilidad positiva
- Repetir el procedimiento con cada aislado de cada variante y registrar resultados.

#### 6.7.5 Realización de la tinción Schaeffer-Fulton

- Usar un portaobjetos por variante y rotular cinco espacios como 1, 2, 3, 4 y 5 para cada variante y el medio cooked meat
- Flamear el asa , tomar una gota de agua estéril y colocar en el centro de un portaobjetos previamente rotulado con el asa estéril, tomar una colonia del agar nutritivo y colocarla sobre la gota de agua y homogeneizar
- Dejar secar al aire y fijar al mechero e ir preparando las demás laminillas
- Una vez listas las laminillas de las 5 cajas de cada variante y del medio cooked meat colocar en el tren de tinción
- Sumergir las laminillas en una caja Petri de vidrio con colorante verde de malaquita
- Calentar a emisión de vapores por 5-10min sin sobrecalentar, pero sin que el colorante se evapore
- Cubrir con safranina por 1 min de igual forma en una caja Petri de vidrio, enjuagar con agua y dejar secar
- Observar al microscopio con el objetivo de 100x utilizando aceite de inmersión
- Registrar resultados en la tabla correspondiente

## 6.8 Inoculación e interpretación de las pruebas bioquímicas secundarias

### 6.8.1 Medio O/F

- Rotular 40 tubos con sus respectivos nombres y números de caja de cada variante y el medio cooked meat
- Inocular el medio por picadura con el asa recta y en zona de esterilidad, en este caso se utilizan dos tubos:
  - Tubo O: Dejar la tapa ligeramente abierta
  - Tubo F: Añadir una capa de aceite mineral estéril de 1cm de espesor
- Colocar los tubos en un recipiente para dejar incubando en la estufa a 37°C durante 24-48hrs.
- Al término de ese tiempo, sacar los tubos y registrar el viraje del medio

### 6.8.2 Citratos

- Rotular 20 tubos como Var<sub>1</sub> Tubo 1, Var<sub>1</sub> Tubo 2... Var<sub>2</sub> tubo 1, Var<sub>2</sub> tubo 2... y así sucesivamente.
- Inocular suavemente y en zona de esterilidad la parte superior del agar formando estrías
- Colocar los tubos en un recipiente para dejar incubando en la estufa a 37°C durante 24-48hrs con el tapón flojo.
- Al término de ese tiempo, sacar los tubos y registrar el viraje del medio

### 6.8.3 Nitratos

- Rotular 20 tubos igual que en el punto 6.8.2
- Flamear y enfriar el asa, tomar un inóculo pesado del agar nutritivo y sembrar disgregando en el caldo.
- Flamear el asa y la boquilla de los tubos y colocarlos en un recipiente para su posterior incubación a 37°C por 48hrs
- Transcurrido ese tiempo, sacar los tubos de la estufa y añadir a cada uno tres gotas de ácido sulfanílico y  $\alpha$ -naftilamina, debe aparecer un color rojo y se reporta como positivo
- Si no hay coloración, agregar polvo de zinc. Si vira a rojo la prueba es negativa, si mantiene la ausencia de color es positivo

#### 6.8.4 Rojo de Metilo (RM) – Voges Proskauer (VP)

- Rotular 20 tubos igual que en el punto 6.8.2
- Flamear y enfriar el asa, tomar un inóculo pesado del agar nutritivo y sembrar disgregando en el caldo.
- Flamear el asa y la boquilla de los tubos y colocarlos en un recipiente para su posterior incubación a 37°C por 24hrs para realizar la primer prueba
- Transcurrido ese tiempo, sacar los tubos de la estufa y separar el caldo en dos alícuotas, un tubo se rotulará como MR y otro como VP
- A los tubos rotulados como MR añadir cuatro gotas del indicador rojo de metilo, debe aparecer una coloración roja inmediata y se reporta como positivo
- Los tubos rotulados como VP se incuban 24hrs más, posterior a ese tiempo, se les agregan 6 gotas de solución  $\alpha$ -naftol y 2 gotas de KOH al 40%, en ese orden
- Agitar, observar y registrar resultados. La formación de un anillo en la parte superior color rojo es indicativo de la producción de acetoína

#### 6.8.5 Prueba de hidrólisis de gelatina

- Rotular 20 tubos igual que en el punto 6.8.2
- Con un asa recta, sembrar por punción sin tocar el fondo del tubo
- Incubar a 37°C por 48 hrs
- Transcurrido ese tiempo, dejar enfriar a temperatura ambiente y después refrigerar a 4°C por 10min
- Inclinar los tubos para observar si existe licuefacción y registrar resultados

### 6.9 Inoculación e interpretación de los medios caseína y lecitina

#### 6.9.1 Prueba de hidrólisis de caseína

- Rotular 20 cajas del medio caseína igual que en el punto 6.8.2
- Flamear y enfriar el asa, tomar un inóculo de una colonia aislada del agar nutritivo y sembrar una estría en el centro de la caja.
- Colocar las cajas en incubación a 37°C por 24-48hrs
- Transcurrido ese tiempo, sacar las cajas de la estufa y revelar la hidrólisis añadiendo unos mL de lugol concentrado hasta cubrir la superficie completamente

- Registrar resultados

#### 6.9.2 Prueba de hidrólisis de lecitina

- Rotular 20 cajas del medio lecitina igual que en el punto 6.8.2
- Flamear y enfriar el asa, tomar un inóculo de una colonia aislada del agar nutritivo y sembrar una estría en el centro de la caja.
- Colocar las cajas en incubación a 37°C por 24-48hrs
- Transcurrido ese tiempo, sacar las cajas de la estufa y revelar la hidrólisis añadiendo unos mL de lugol concentrado hasta cubrir la superficie completamente
- Registrar resultados

Nota: Una vez que se terminan de utilizar todas las cajas del medio agar nutritivo se sellan con masking tape y se guardan en una bolsa para cajas Petri previamente desinfectada con benzal.

#### 6.10 Identificación de las bacterias esporuladas obtenidas

Contrastar los resultados experimentales con los resultados teóricos para generar algoritmos de identificación de género y especie de las bacterias obtenidas.

Nota: Ver resumen de la metodología en Anexos 11.

## 7. RESULTADOS

En el cuadro 3, se presentan los resultados obtenidos de los 5 tubos de la Variante 1 (croqueta de perro), de la Variante 2 (croqueta de gato), de la Variante 3 (caldo de pollo), y los del medio Cooked Meat (CM), en la primer columna se muestran los tubos esterilizados e inoculados con tierra obtenida de la FESC, en la siguiente columna después de ser incubados 6 días a temperatura ambiente protegidos de la luz.

La Variante 1 (Var<sub>1</sub>) con respecto a la Variante 2 (Var<sub>2</sub>) ambas croquetas, difieren en cuanto a color antes y después de la esterilización e incubación, Var<sub>1</sub> tiene un color café claro antes y después se torna oscuro, casi negro como el medio cooked meat. Var<sub>2</sub> es de color café claro antes y después, lo cual nos lleva a pensar que las croquetas de perro contienen más concentrado de proteína.

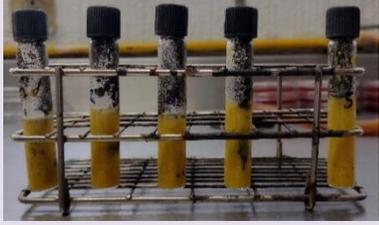
La Variante 3 (Var<sub>3</sub>) definitivamente difiere en cuanto a color (amarillo) de todos los demás tubos antes y después de la esterilización e incubación debido a que contiene más grasas vegetales y probablemente colorantes.

Después del periodo de incubación se observa que Var<sub>1</sub>, Var<sub>2</sub>, y el medio cooked meat tienen en común burbujas debido a la producción de gas.

En Var<sub>3</sub> observamos que las grasas flotan en el agua pero cuando se abrieron los tubos todos desprendieron gas. En cuanto al color del sustrato de Var<sub>1</sub> y del CM que se oscurecieron, también es una característica del desarrollo bacteriano próximo a comprobar.

Después de los días de incubación todos los tubos desprendían un fuerte olor un poco fétido, debido a la utilización y formación de producto de desecho.

**Cuadro 3. Medios alternativos y cooked meat esterilizados e inoculados con tierra obtenida de la FESC, antes y después de la incubación.**

Variante	Tubos	
	Esterilizados e inoculados	6 días de incubación a T° ambiente
<b>Cooked Meat</b> (CM)		
<b>Variante<sub>1</sub></b> (croqueta de alimento para perro)		
<b>Variante<sub>2</sub></b> (croqueta de alimento para gato)		
<b>Variante<sub>3</sub></b> (Caldo de pollo)		

Fotografías tomadas por Nicole Danaé Ávila Basurto en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FES Cuautitlán.

Una vez obtenidos los tubos de las variantes y del medio CM, se procedió a sembrar en agar sangre para realizar un aislamiento primario con la técnica dilución americana, el resultado se muestra en las imágenes de los cuadros 4, 5, 6 y 7 donde podemos observar que los aislamientos comparten características en las colonias en cuanto a color, tamaño, bordes y presentan alfa-hemólisis.

El crecimiento bacteriano en las cajas sembradas de los tubos cooked meat, fue satisfactorio. La caja 1 creció completamente en toda al igual que en la caja 5 de la Var<sub>1</sub>. Las colonias tienen bordes irregulares de color grisáceos y son convexas.

En la Var<sub>1</sub> podemos observar crecimiento profuso en las cajas 1, 2, 3 y 4, en la caja 5 el crecimiento se extendió en toda la caja. Las colonias de todas las cajas tienen bordes irregulares y son convexas, además son de tamaño grande y apariencia mate al observarlas de cerca. También tenían un olor parecido a pescado.

En la Var<sub>2</sub>, las colonias de igual forma dan una propiedad óptica opaca/mate, las colonias son de color grisáceo con aspecto de bordes irregulares en todas. En la caja 2, podemos observar con mayor claridad la presencia de hemólisis alfa. El crecimiento fue en todas las cajas bastante al igual que en la Var<sub>1</sub>. Todas las cajas tenían un olor fétido.

En cuanto a Var<sub>3</sub>, se puede observar que el crecimiento no es tanto en comparación con las dos variantes anteriores, sí se desarrollaron en toda la caja, pero las colonias son de menor tamaño, son del mismo color, y también comparten características como los bordes irregulares y son convexas. En la caja 4 de esta variante se observan algunas colonias aisladas y se aprecia la hemólisis alfa.

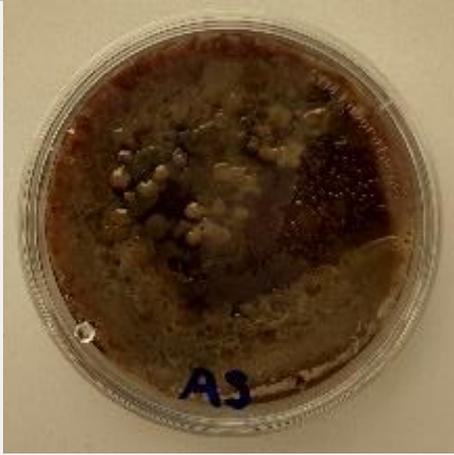
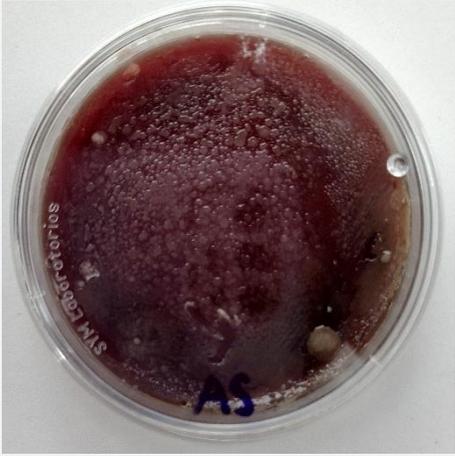
Después de haber realizado el aislamiento primario en agar sangre se identificaron colonias aisladas de los agares sangre de las variantes con mayor parentesco a las desarrolladas en el agar sangre a partir del medio cooked meat y se procedió a sembrar en agar nutritivo. Como resultado podemos ver en los cuadros 8, 9, 10 y 11 que todas las cepas se parecen entre sí, en cuanto a color, forma de las colonias, textura, tamaño y consistencia.

**Cuadro 4. Crecimiento primario en Agar Sangre a partir del medio Cooked Meat**

Caja	Imagen	Caja	Imagen
1		2	
3		4	
		5	

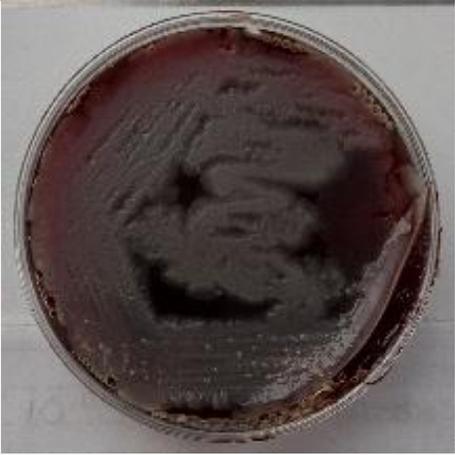
Se muestran los crecimientos obtenidos mediante le técnica dilución americana. Fotografías tomadas en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de FES Cuautitlán por Nicole Danaé Ávila Basurto.

**Cuadro 5. Crecimiento primario en Agar Sangre a partir del medio alternativo croqueta de alimento para perro (Variante 1)**

Caja	Imagen	Caja	Imagen
1		2	
3		4	
5			
			

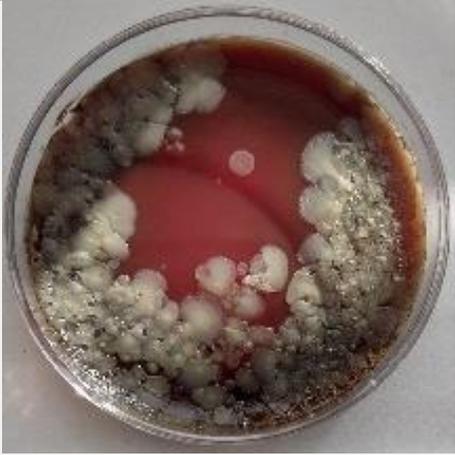
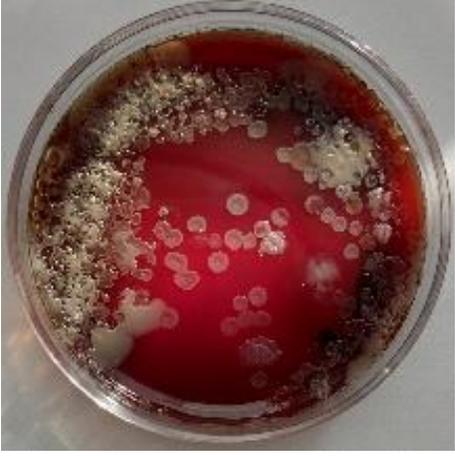
Se muestran los crecimientos obtenidos mediante le técnica dilución americana. Fotografías tomadas en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de FES Cuautitlán por Nicole Danaé Ávila Basurto.

**Cuadro 6. Crecimiento primario en Agar Sangre a partir del medio alternativo croqueta de alimento para gato (Variante 2)**

Caja	Imagen	Caja	Imagen
1		2	
3		4	
5			
			

Se muestran los crecimientos obtenidos mediante le técnica dilución americana. Fotografías tomadas en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de FES Cuautitlán por Nicole Danaé Ávila Basurto.

**Cuadro 7. Crecimiento primario en Agar Sangre a partir del medio alternativo caldo de pollo en polvo (Variante 3)**

Caja	Imagen	Caja	Imagen
1		2	
3		4	
5			
			

Se muestran los crecimientos obtenidos mediante la técnica de dilución americana. Fotografías tomadas en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de FES Cuautitlán por Nicole Danaé Ávila Basurto.

**Cuadro 8. Crecimiento y purificación en agar nutritivo a partir del agar sangre del medio Cooked Meat**

Caja	Imagen	Caja	Imagen
1		2	
3		4	
5			
			

Se muestran los crecimientos obtenidos mediante le técnica dilución americana. Fotografías tomadas en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de FES Cuautitlán por Nicole Danaé Ávila Basurto.

**Cuadro 9. Crecimiento y purificación en agar nutritivo a partir del agar sangre del medio alternativo croqueta de alimento para perro (Variante 1)**

Caja	Imagen	Caja	Imagen
1		2	
3		4	
5			
			

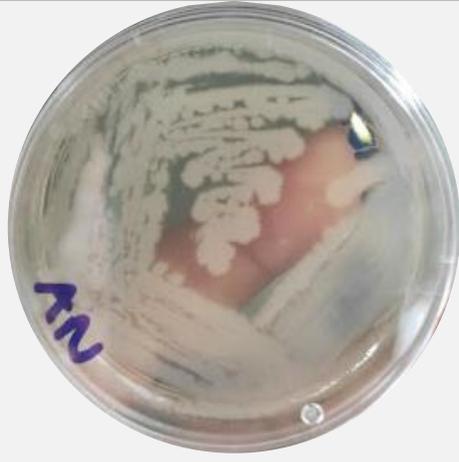
Se muestran los crecimientos obtenidos mediante la técnica de dilución americana. Fotografías tomadas en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de FES Cuautitlán por Nicole Danaé Ávila Basurto.

**Cuadro 10. Crecimiento y purificación en agar nutritivo a partir del agar sangre del medio alternativo croqueta de alimento para gato (Variante 2)**

Caja	Imagen	Caja	Imagen
1		2	
3		4	
5			
			

Se muestran los crecimientos obtenidos mediante la técnica de dilución americana. Fotografías tomadas en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de FES Cuautitlán por Nicole Danaé Ávila Basurto.

**Cuadro 11. Crecimiento y purificación en agar nutritivo a partir del agar sangre del medio alternativo caldo de pollo en polvo (Variante 3)**

Caja	Imagen	Caja	Imagen
1		2	
3		4	
5			
			

Se muestran los crecimientos obtenidos mediante la técnica de dilución americana. Fotografías tomadas en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de FES Cuautitlán por Nicole Danaé Ávila Basurto.

A continuación, en la tabla 1 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas primarias y secundarias de los aislados, los que presenten los mismos resultados se les asignarán los mismos colores.

**Tabla 1. Resultados de las pruebas bioquímicas primarias y secundarias de los aislamientos del medio alternativo Var<sub>1</sub>**

Prueba		Tubos				
		1	2	3	4	5
Gram	+ ó -	+	+	+	+	+
	Morfología	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
	Agrupación	Pares o Cadenas				
Catalasa		+	+	+	+	+
Oxidasa		-	-	-	-	-
Motilidad		+	+	+	+	+
Oxido/Fermentación	O					
	F					
Citratos		-	-	-	-	-
Nitratos		+	+	+	+	+
MR		+	+	+	+	+
VP		-	+	-	+	+
Hidrólisis de gelatina		+	+	+	+	+
Hidrólisis de caseína		+	+	+	+	+
Prueba de Lecitinasa		+	+	+	+	+

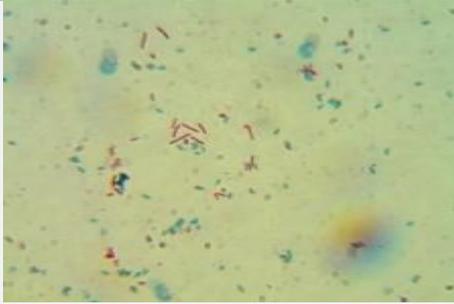
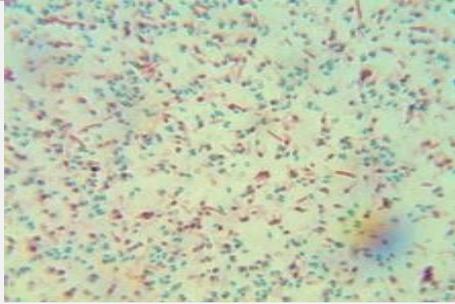
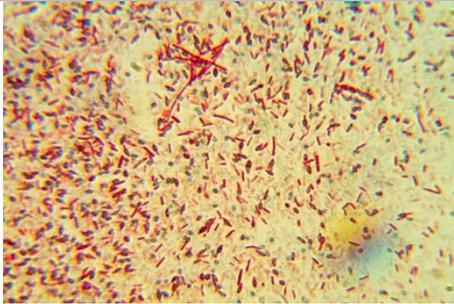
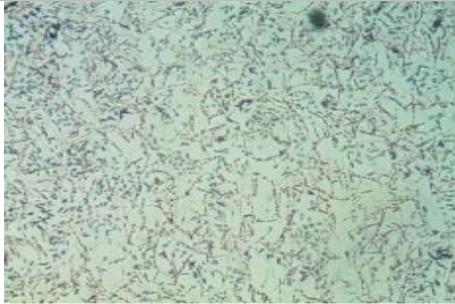
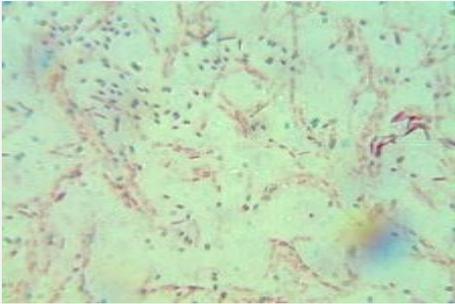
Características diferenciales de los aislamientos de la variante 1 obtenidos en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FES Cuautitlán.

+ = Positivo

- = Negativo

Según los resultados obtenidos en la tabla 1 respecto a los aislamientos de Var<sub>1</sub>, se logró agruparlas dependiendo de su metabolismo oxidativo o fermentativo y la prueba VP marcado en rojo, obteniendo tres colores, es decir, en esta variante se obtuvieron 3 especies diferentes, pero aun así debemos continuar con la tinción de esporas para poder establecer la especie a la que pertenece cada una.

**Cuadro 12. Tinción Schaeffer-Fulton realizada a partir del agar nutritivo del medio alternativo Var<sub>1</sub>**

Caja	Imagen	Caja	Imagen
<b>1</b>		<b>2</b>	
<b>3</b>		<b>4</b>	
<b>5</b>			
			

Fotografías en 1000x de los aislamientos de Var<sub>1</sub> obtenidos en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FES Cuautitlán, tomadas por Nicole Danaé Ávila Basurto

En todas las fotografías del cuadro 12 se observan en color rojo los bacilos y en color verde las esporas. Los bacilos predominan más en la fotografía del aislamiento de la caja número 4 observándose agrupados en cadenas largas. El aislado de la caja 1 presenta algunos bacilos, pero en mayor cantidad esporas libres. Los bacilos de la caja 3 tienen esporas que deforman la célula dándoles forma de “raqueta”.

**Tabla 2. Resultados de las pruebas bioquímicas primarias y secundarias de los aislamientos del medio alternativo Var<sub>2</sub>**

Prueba		Tubos				
		1	2	3	4	5
Gram	+ ó -	+	+	+	+	+
	Morfología	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
	Agrupación	Pares o Cadenas				
Catalasa		+	+	+	+	+
Oxidasa		-	-	-	-	-
Motilidad		+	+	+	+	+
Oxido/Fermentación	O					
	F					
Citratos		-	-	-	-	-
Nitratos		+	+	+	+	+
MR		+	+	+	+	+
VP		-	-	-	-	-
Hidrólisis de gelatina		+	+	+	+	+
Hidrólisis de caseína		+	+	+	+	+
Prueba de Lecitinasa		+	+	+	+	+

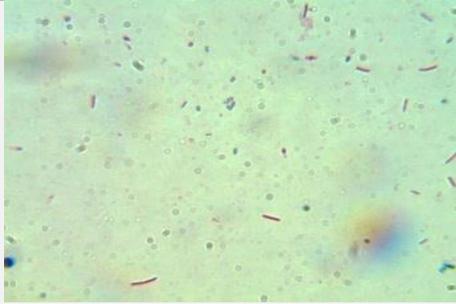
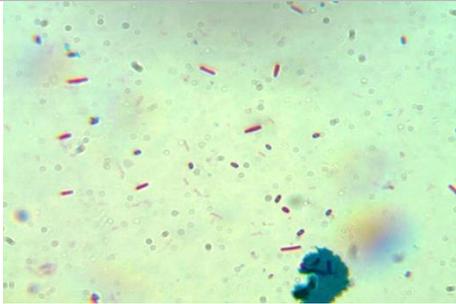
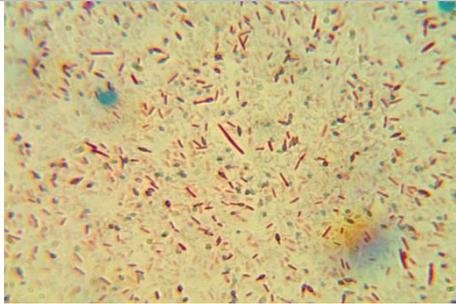
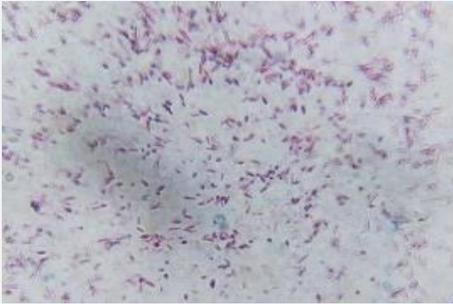
Características diferenciales de los aislamientos de la variante 2 obtenidos en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FES Cuautitlán.

+ = Positivo

- = Negativo

Con base en los resultados de la tabla 2, se obtuvieron también 3 colores, es decir, 3 especies diferentes, pero, dos de ellas coincidían con el aislado de la caja 1 de la Variante<sub>1</sub> y otras dos con la caja 3 de la Variante<sub>1</sub>. En este caso, para hacer la diferenciación de especies fue con base en su metabolismo en la prueba O/F. Hasta este momento llevamos 4 especies diferentes aisladas en las dos primeras variantes.

**Cuadro 13. Tinción Schaeffer-Fulton realizada a partir del agar nutritivo del medio alternativo Var<sub>2</sub>**

Caja	Imagen	Caja	Imagen
1		2	
3		4	
5			
			

Fotografías en 1000x de los aislamientos de Var<sub>2</sub> obtenidos en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FES Cuautitlán, tomadas por Nicole Danaé Ávila Basurto

En las imágenes del cuadro 13 se observan nuevamente bacilos de color rojo y esporas libres de color verde sobre todo en el aislamiento de la caja 1. Los bacilos de la caja 3 se observan más cortos y gruesos en comparación a los de los demás.

**Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas primarias y secundarias de los aislamientos del medio alternativo Var<sub>3</sub>**

Prueba		Tubos				
		1	2	3	4	5
Gram	+ ó -	+	+	+	+	+
	Morfología	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
	Agrupación	Pares o Cadenas				
Catalasa		+	+	+	+	+
Oxidasa		-	-	-	-	-
Motilidad		+	+	+	+	+
Oxido/Fermentación	O					
	F					
Citratos		-	-	-	-	-
Nitratos		+	+	+	+	+
MR		+	+	+	+	+
VP		-	-	-	-	-
Hidrólisis de gelatina		+	+	+	+	+
Hidrólisis de caseína		+	+	+	+	+
Prueba de Lecitinasa		+	+	+	+	+

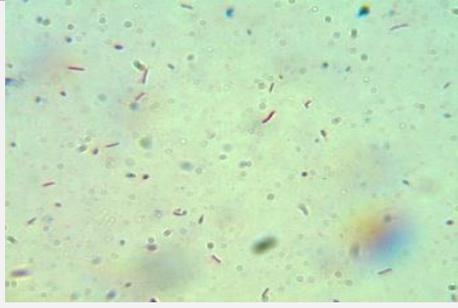
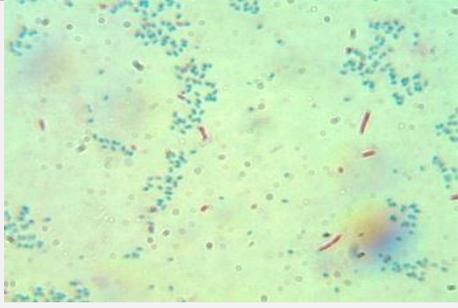
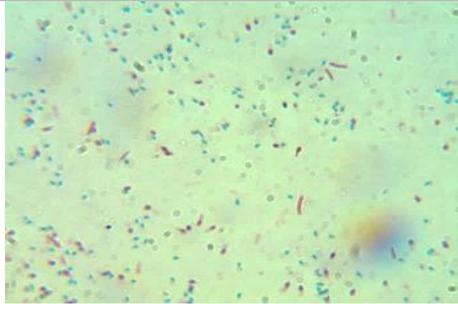
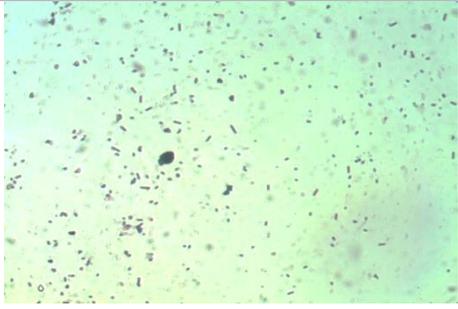
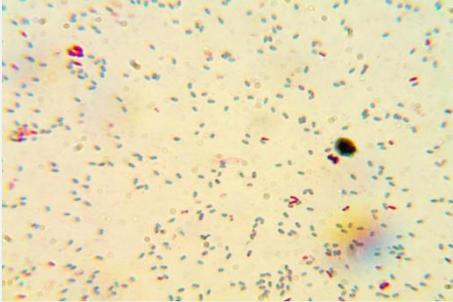
Características diferenciales de los aislamientos de la variante 3 obtenidos en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FES Cuautitlán.

+ = Positivo

- = Negativo

Los resultados de la tabla 3 nos muestran solamente dos especies que ya habíamos agrupado antes, coinciden los resultados con varios aislamientos de Var<sub>1</sub> y Var<sub>2</sub>.

**Cuadro 14. Tinción Schaeffer-Fulton realizada a partir del agar nutritivo del medio alternativo Var<sub>3</sub>**

Caja	Imagen	Caja	Imagen
1		2	
3		4	
5			
			

Fotografías en 1000x de los aislamientos de Var<sub>3</sub> obtenidos en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FES Cuautitlán, tomadas por Nicole Danaé Ávila Basurto

En las fotografías de todas los aislamientos de Var<sub>3</sub> se observan pocos bacilos y más esporas en comparación con las demás variantes y el medio cooked meat.

**Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas primarias y secundarias de los aislamientos del medio cooked meat**

		Tubos				
Prueba		1	2	3	4	5
Gram	+ ó -	+	+	+	+	+
	Morfología	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
	Agrupación	Pares o Cadenas				
Catalasa		+	+	+	+	+
Oxidasa		-	-	-	-	-
Motilidad		+	+	+	+	+
O/F	Abierto					
	Cerrado					
Citratos		-	+	-	-	+
Nitratos		+	+	+	+	+
MR		+	+	+	+	+
VP		-	-	-	+	-
Hidrólisis de gelatina		+	+	+	+	+
Hidrólisis de caseína		+	+	+	+	+
Prueba de Lecitinasa		+	+	+	+	+

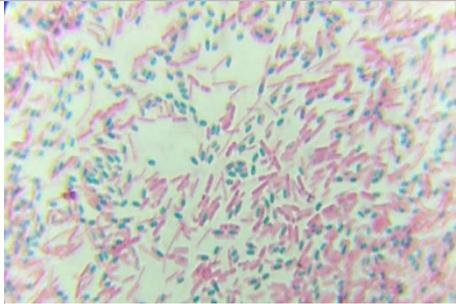
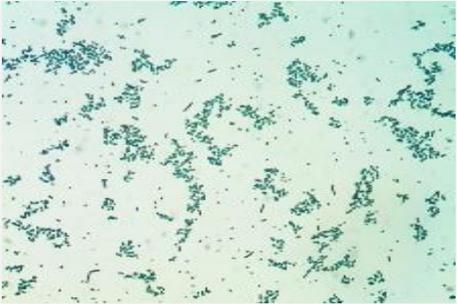
Características diferenciales de los aislamientos del medio CM obtenidos en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FES Cuautitlán.

+ = Positivo

- = Negativo

En los resultados del medio CM de la tabla 4 se aislaron cinco especies, tres de ellas ya estaban agrupadas con las variantes anteriores, por lo tanto, de este medio obtuvimos únicamente 2 especies diferentes. La diferenciación se realizó principalmente con base en las pruebas O/F, citratos y VP.

**Cuadro 15. Tinción Schaeffer-Fulton realizada a partir del agar nutritivo del medio cooked meat**

Caja	Imagen	Caja	Imagen
1		2	
3		4	
5			
			

Fotografías en 1000x de los aislamientos del medio CM obtenidos en el laboratorio 10 del edificio de posgrado e investigación de la FES Cuautitlán, tomadas por Nicole Danaé Ávila

En los aislamientos del medio Cooked Meat también se observan bacilos y esporas, pero en este caso es muy notoria la diferencia en cuanto a agrupación de las especies de las cajas 2 y 5 en relación con las demás.

Contrastando estos resultados con los teóricos que se presentan a continuación en las tablas 6 y el cuadro 15, tenemos tentativamente las especies a las que pueden corresponder cada una de las seis.

Se realizó una recopilación de los resultados de referencia de las pruebas bioquímicas primarias y secundarias de las especies de *Bacillus* aisladas más comúnmente de suelos y los resultados se muestran en la tabla 5.

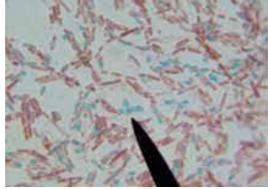
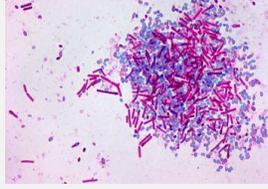
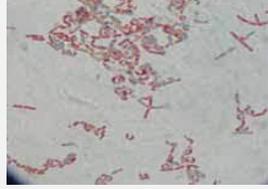
**Tabla 5. Pruebas bioquímicas teóricas primarias y secundarias de las especies de *Bacillus* más comúnmente aisladas de suelos.**

Especie		Resultado					
		<i>B. firmus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. sphaericus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. Coagulans</i>
Gram	+ ó -	+	+	+	+	+	+
	Morfología	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos
	Agrupación	Pares o Cadenas	Pares o Cadenas	Pares o Cadenas	Pares o Cadenas	Pares o Cadenas	Pares o Cadenas
Catalasa		+	+	+	+	+	+
Oxidasa		-	-	-	-	-	-
Motilidad		+	+	+	+	+	+
O/F	Abierto						
	Cerrado						
Citratos		-	-	-	-	+	+
Nitratos		+	+	+	+	+	+
MR		+	+	+	+	+	+
VP		-	+	-	-	-	-
Hidrólisis de gelatina		+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de caseína		+	+	+	+	+	+
Prueba de Lecitinasa		+	+	+	+	+	+

(Logan, 2015); (Gorgoroso, 2012); (Sosa, 2011); (Cuervo, 2011); (Lagunas, 2001);  
(Cullimore, 2000); (García, 1998); (Gutiérrez, 1980); (Carbonero, 1975)

También se realizó una recopilación de imágenes de referencia de las especies de *Bacillus* aisladas más comúnmente de suelos teñidas con el método de Schaeffer-Fulton y los resultados se muestran en el cuadro 15.

**Cuadro 15. Especies de *Bacillus* más comúnmente aisladas de suelos teñidas con el método Schaeffer-Fulton.**

Espece	Imagen de referencia	Espece	Imagen de referencia
1. <i>B. firmus</i>		4. <i>B. sphaericus</i>	
2. <i>B. subtilis</i>		5. <i>B. megaterium</i>	
3. <i>B. circulans</i>		6. <i>B. coagulans</i>	

Fotografías en 1000x de las cepas más comúnmente aisladas de *Bacillus*.  
(UNICACH, 2014); (Domínguez, 2013); (Versalovic, 2011); (Clark, 1977)

Como se menciona en el marco teórico, *Bacillus* es un género ampliamente difundido en la naturaleza, en este caso específicamente en el suelo. De 20 cepas aisladas se obtuvieron 6 especies las cuales se encuentran reportadas en la tabla 6.

**Tabla 6. Género y especie de los aislados en el laboratorio 10 de posgrado e investigación de la FESC por Nicole Danaé Ávila Basurto.**

Variante	Caja	Especie
Croqueta de perro (Var <sub>1</sub> )	1	<i>B. firmus</i>
	2	<i>B. subtilis</i>
	3	<i>B. sphaericus</i>
	4	<i>B. subtilis</i>
	5	<i>B. subtilis</i>
Croqueta de gato (Var <sub>2</sub> )	1	<i>B. firmus</i>
	2	<i>B. firmus</i>
	3	<i>B. circulans</i>
	4	<i>B. sphaericus</i>
	5	<i>B. sphaericus</i>
Caldo de pollo en polvo (Var <sub>3</sub> )	1	<i>B. firmus</i>
	2	<i>B. firmus</i>
	3	<i>B. firmus</i>
	4	<i>B. circulans</i>
	5	<i>B. circulans</i>
Cooked meat (CM)	1	<i>B. firmus</i>
	2	<i>B. megaterium</i>
	3	<i>B. circulans</i>
	4	<i>B. subtilis</i>
	5	<i>B. coagulans</i>

## 8. DISCUSIÓN

Analizando la información presentada en el cuadro 2 que se encuentra ubicado en el marco teórico, los sustratos alternativos y el medio cooked meat son muy semejantes en cuanto a composición nutrimental. Al tener casi la misma cantidad de proteínas, minerales y carbohidratos se pueden considerar como una opción óptima para el desarrollo de bacterias esporuladas.

Las croquetas para perro y para gato son las que más semejanzas comparten, entre ellas y con el medio cooked meat. El caldo de pollo presenta una menor cantidad de proteínas que los demás sustratos y una mayor cantidad de carbohidratos, pero estos últimos también son de ayuda para el desarrollo bacteriano.

Cuando se aumenta la temperatura, en este caso con el baño María, cambia la estructura de las proteínas dando como resultado final una desnaturalización proteica. A esto se le llama reacción de Maillard, una glicación no enzimática de las proteínas, es decir, se genera una modificación que se produce por un cambio químico de los aminoácidos constituidos. Dicho cambio, modifica las propiedades organolépticas, llegando a ser beneficioso porque facilita la digestión y absorción de las proteínas. (Hernández, 2023)

El crecimiento se indica mediante turbidez y, en el caso de algunos organismos, con la presencia de burbujas de gas en el medio. La desintegración y oscurecimiento de las partículas de carne indican proteólisis. (BD, 2015) Esta reacción se pudo observar en todos los tubos de todas las variantes a los 6 días de incubación.

En un principio, cuando las células de *Bacillus* están creciendo activamente en un medio rico en nutrientes en este caso los medios alternativos, carecen de flagelos, cuando los nutrientes comienzan a escasear se induce la síntesis de flagelos y se “desplazan” a zonas donde se concentra la mayoría de los nutrientes que quedan.

Si los nutrientes siguen escaseando, ahora sí se da “señal” a la célula de que pasarán un largo periodo sin nutrientes, entonces la respuesta que se desencadena son cambios de expresión genética, metabólicos y estructurales (proceso de esporulación), que conducen a la diferenciación, en el interior de la célula vegetativa original,

finalmente, después de producir la endospora la célula madre se lisa, liberando la espora. (Iañez, 1998)

Como se explica en el marco teórico, para facilitar el crecimiento y aislamiento de cualquier microorganismo, es necesario brindarle un medio de cultivo que contenga todos los requerimientos nutricionales, en los manuales de diagnóstico se recomienda el agar sangre como un medio de aislamiento primario.

Al tener desarrollo bacteriano y observar macroscópicamente las colonias, se determinó que todas compartían características fenotípicas como la hemólisis de los glóbulos rojos del medio, la textura, el tamaño y la forma de las colonias, entre otros, hasta aquí se considera que presuntamente se aisló el mismo género y que los medios alternativos están cumpliendo su función.

Las pruebas bioquímicas primarias son importantes porque con ellas se va a determinar el género de la bacteria aislada. Si observamos los resultados de las tablas 1, 2, 3 y 4 coinciden entre ellos mismos, ahora, si estos mismos los comparamos con la tabla 5 de igual forma se relacionan con los resultados de referencia de las cepas de *Bacillus* aisladas más comúnmente de suelos.

Teóricamente el género *Bacillus* consta de bacilos grandes, Gram positivos, esporógenos. Las células poseen extremos cuadrados y se disponen en forma de pares o cadenas largas o cortas; las esporas se ubican en su mayoría en el centro de los bacilos, pero también pueden deformarlos. (García, 1998)

Una característica de las especies de *Bacillus*, es la capacidad de producir esporas en presencia de oxígeno. (Tamez, 2013)

Los miembros de este género tienen relación estrecha, pero difieren tanto desde una perspectiva fenotípica como en términos de patogenicidad. (Carroll, 2016) Son catalasa positivo (algunos más que otros), oxidasa negativo y en su mayoría, móviles.

El hecho de decir que son catalasa positivo, nos está indicando que contienen la enzima catalasa para convertir la molécula  $H_2O_2$  en agua y en  $O_2$ , esta prueba se usa principalmente para diferenciar entre el género *Bacillus* y *Clostridium*. La mayoría de las bacterias anaerobias estrictas como *Clostridium* poseen oxidasas en vez de catalasas.

Las pruebas bioquímicas secundarias (Citratos, nitratos, MR-VP, hidrólisis de gelatina, hidrólisis de caseína y prueba de Lecitinasa) son de suma importancia para la identificación de la especie, en estas pruebas y analizando las tablas 1, 2, 3 y 4 nuevamente, se puede observar que la diferenciación se basa principalmente en la prueba de O/F, citratos y VP.

La prueba de O/F nos indicará el tipo de metabolismo de la bacteria (oxidativos o fermentativos) y aunque algunos coincidan en esa característica, la prueba citrato nos hará otra diferencia, pues no todos pueden utilizar el citrato como única fuente de carbono y así mismo, no todas las cepas son capaces de fermentar la glucosa por la vía butanodiólica. Estas diferencias permiten agrupar los aislados para después, con base en la tinción de Schaeffer-Fulton, comprobar la especie.

Los aislados del medio agar nutritivo de la caja 1 de la Variante<sub>1</sub>, croqueta de perro, Cajas 1 y 2 de la Variante<sub>2</sub>, croqueta de gato; Cajas 1, 2 y 3 de la Variante<sub>3</sub>, caldo de pollo, y la caja 1 del medio Cooked Meat (CM), comparten las mismas características metabólicas y bioquímicas.

Son oxidativos, es decir, crecen y esporulan en presencia de oxígeno. Son citratos negativo, es decir que no usan al citrato como única fuente de carbono en su metabolismo y son VP negativo, lo cual indica que no se lleva a cabo la fermentación acetoínica, con base en los resultados teóricos de la tabla 5 y en los resultados de la tinción de Schaeffer-Fulton de las cepas mencionadas anteriormente, se comprueba que la especie pertenece a *B. firmus*.

El segundo aislado fue *B. subtilis*, el cual tiene un agrupamiento muy característico, crece en cadenas alargadas con bordes redondeados como “tabiques”, los bacilos tienen esporas centrales, no deforman a la célula, pero las hacen ver más gruesas. Las cepas de las cajas 2, 4 y 5 de la Variante<sub>1</sub> del medio agar nutritivo y la cepa de la caja 4 del medio CM son muy notorio que pertenecen a esta especie.

Los aislados mencionados anteriormente tienen resultados iguales en cuanto a pruebas bioquímicas primarias y secundarias, son bacilos Gram positivos, oxidativos y son la única especie VP positivo aislada, es decir, fermentan la glucosa por la vía butanodiólica, produciendo como producto terminal 2, 3 butanodiol.

En el aislamiento de la caja 4 del medio CM con base en la tinción Schaeffer-Fulton se aprecian muy bien las esporas de color verde, dentro y fuera de los bacilos. En la tinción de esporas de la caja 2 de la variante<sup>1</sup> no es tan notorio el crecimiento en cadenas, pero sí se observa una cantidad considerable de bacilos gruesos junto con sus esporas.

Además, todos los aislamientos mencionadas anteriormente tienen resultados iguales en cuanto a pruebas bioquímicas primarias y secundarias, son oxidativos y la única especie VP positivo, es decir, indicativo de la producción de acetoina.

Posteriormente se agrupó de la siguiente manera los aislamientos de la caja 3 de la variante<sup>2</sup>, cajas 4 y 5 de la variante<sup>3</sup> y caja 3 del medio CM. La especie de referencia es *B. circulans*, esta especie es anaerobia facultativa y es citrato negativo. Bajo visión microscópica observamos que contienen endosporas subterminales y terminales, los bacilos son cortos y hay muy pocos en comparación con las esporas libres.

*B. circulans* se puede llegar a confundir con *B. coagulans* por el tipo de metabolismo, sin embargo, esta segunda especie es citrato positivo. Además, la forma de agruparse de ambas especies difiere.

El aislamiento de la caja 5 del medio CM se diferencia de las demás al ser anaerobia facultativa y citrato positivo, bajo visión microscópica, se observan aglomeraciones de las esporas y algunos bacilos libres, morfológicamente se parece a *B. megaterium*, pero aún más aglomerado. Este aislamiento pertenece a la especie *B. coagulans*.

Los últimos dos aislados se colocaron en los géneros *B. sphaericus* y *B. megaterium*, estos dos dieron como resultado en la prueba O/F ser fermentativos. La fermentación es un proceso anaeróbico que requiere la fosforilación inicial de la glucosa antes de la degradación a una mezcla de ácidos relativamente fuertes. (Lippincott, 2000)

De la misma forma, se pueden diferenciar por la utilización o no del citrato, *B. megaterium* tiene la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono para su crecimiento, además, las esporas de *B. megaterium* con base en la tinción de Schaeffer-Fulton se encuentran en su mayoría libres en el medio, en contraste con las esporas de *B. sphaericus*, donde las esporas están dentro de los bacilos deformándolos.

*B. sphaericus* es sin duda una de las especies más fáciles de distinguir, principalmente por su metabolismo oxidativo evidenciado en la prueba de O/F seguido de la observación con el microscopio óptico, pues sus esporas deforman completamente a la célula vegetativa dándoles forma de “raqueta” como se aprecia en las imágenes de los aislamientos de la caja 3 variante<sub>1</sub> y las cajas 4 y 5 de la variante<sub>2</sub> respectivamente.

*B. megaterium* tiene una forma muy característica de crecimiento donde se observan esporas libres y los bacilos algunos cerca de otros formando letras tipo "y" o "v", se observa en 1000x en el cuadro 15 en la caja 2 del medio CM como si los bacilos estuvieran “unidos” por un camino de esporas, las esporas están libres y son abundantes, pero forman tipo “redes” entre ellas y entre los bacilos, también esta especie es citrato positivo como se mencionó anteriormente.

Todas las cepas de todas las variantes aisladas comparten la característica de ser Gram positivos, oxidasa negativos, móviles, nitratos, MR, lecitina, caseína y gelatina positivos. La prueba de nitratos se fundamenta en la reducción de estos como se explicó en el marco teórico, al momento de añadir los reactivos la reacción fue instantánea en todas las cepas.

La prueba MR pone de manifiesto la capacidad de las cepas de llevar a cabo la ruta ácido-mixta y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa: ácido fórmico, láctico, acético y succínico. El resultado positivo de esta prueba lo comparten todos los aislamientos de todas las variantes y el medio cooked meat.

En cuanto a las pruebas de lecitina, caseína y gelatina, todos los aislamientos de todas las variantes son positivo a las tres, confirmando la presencia de las enzimas lecitinasas, caseinasas y gelatinasas.

La producción de la enzima lecitinasa se comprueba con la aparición de una zona opaca alrededor del crecimiento microbiano, indicando que las bacterias son capaces de hidrolizar a la lecitina presente en la yema de huevo.

La caseínasa, es una enzima capaz de hidrolizar la proteína láctea caseína en pequeños aminoácidos y péptidos formando zonas transparentes alrededor de las colonias.

Las enzimas gelatinasas son capaces de hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos, “licuando” el medio.

Analizando la tabla 6, *B. firmus* es la especie mayormente aislada, pues como podemos ver, por lo menos se aisló una cepa en todas las variantes y el medio CM. Los medios alternativos y el medio CM le ofrecen a esta especie los requerimientos nutricionales adecuados para su desarrollo (proteínas, vitaminas y minerales principalmente).

*B. subtilis* solamente se desarrolló en los dos medios que más compartieron características nutricionales, la variante<sub>1</sub> (croqueta de perro) y el medio CM. Probablemente los nutrimentos de los otros dos medios fueron escasos para lograr su desarrollo. *Bacillus subtilis* es una bacteria cosmopolita presente en numerosos hábitats y resulta ser un excelente agente de control biológico de enfermedades causadas por hongos de suelo y bacterias. (Control Bío, 2015)

*B. circulans* no tuvo desarrollo en el medio variante<sub>1</sub> (croqueta de perro), pero en todos los demás medios sí. (Sarmiento, 2022)

*B. sphaericus* solamente tuvo desarrollo en los medios alternativos donde el sustrato fue sustituido por las croquetas para perro, variante<sub>1</sub> y croqueta de gato variante<sub>2</sub>.

*B. megaterium* y *B. coagulans* solamente se desarrollaron en el medio Cooked Meat. En la década de 1960, *B. megaterium* fue el organismo modelo usado para estudios sobre la esporulación, ya que esporula y germina muy eficientemente (Tortoló, 2015).

En resumen, el medio que más tuvo diferenciación de especies fue el medio cooked meat, seguido de los medios croquetas para perro marca ganador® (Var<sub>1</sub>), croquetas para gato marca gatina® (Var<sub>2</sub>) y Knorr® Suiza, caldo de pollo en polvo, (Var<sub>3</sub>).

La especie mayormente aislada fue *B. firmus*, seguido de *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. sphaericus*, *B. megaterium* y *B. coagulans*.

## 9. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo la elaboración de los medios de cultivo alternativos y semejantes al medio cooked meat con base en las características de composición nutrimental.

Se comprueba la hipótesis establecida con base en el porcentaje de recuperación de bacterias esporuladas.

Se logró la identificación de las especies *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. megaterium* y *B. coagulans* realizando pruebas bioquímicas primarias, secundarias y la tinción de Schaeffer-Fulton.

Los medios alternativos pueden utilizarse como alternativa o apoyo académicos para realizar prácticas de laboratorio del área de bacteriología y microbiología de la FES Cuautitlán.

## 10. REFERENCIAS

- Anton, V. (2020) Microbiology. Schaeffer Fulton stain of bacilli. Disponible en: [Tinción Schaeffer Fulton de bacilos // Schaeffer Fulton stain of bacilli . . . . . #microbiology #petridish #microbiologia... | Instagram](#)
- Arumí, M. (2023) Medios de cultivo. Disponible en: [Medios de Cultivo – Microbiología para humanos \(wordpress.com\)](#)
- BD Diagnostics, (2013) BBL Columbia Agar with 5% Sheep Blood. Disponible en: [resource.aspx \(bd.com\)](#)
- BD Diagnostics, (2014) BBL Nutrient Agar L007481 • Rev. 10. Disponible en: [resource.aspx \(bd.com\)](#)
- BD Diagnostics, (2015) BBL Cooked Meat Medium L007448 • Rev. 12. Disponible en: [resource.aspx \(bd.com\)](#)
- Britania, Laboratorios. [\(2021\) Sangre Agar Base. REV. 0.2 Argentina. Disponible en: upl\\_6070906bed89d.pdf \(britanialab.com\)](#)
- Carbonero, P. (1975). Bioquímica de las fermentaciones. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid. ISBN 8460067548. Disponible en: [FERMENTACIONES.pdf \(upm.es\)](#)
- Carroll, K. & Hobden, J. (2016) Bacilos grampositivos formadores de esporas: *Bacillus* y *Clostridium*. Microbiología médica, 27e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1837&sectionid=128956862>
- Castillo, L. (2012) TESIS. Identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores para aplicación en celdas de combustible microbianas y en biorremediación. Disponible en: [Tesis Luz Carmen Castillo Martínez.pdf \(repositorioinstitucional.mx\)](#)
- Clark, W. (1977) PHIL. Centers for Disease Control and Prevention. *Bacillus*. Disponible en: [Details - Public Health Image Library\(PHIL\) \(cdc.gov\)](#)
- Control Bío, (2015) Uso de *Bacillus subtilis* como biofungicida. [Disponible en: Uso de BACILLUS SUBTILIS como biofungicida en agricultura y jardinería \(controlbio.es\)](#)

- Cuervo, J. (2010) tesis. Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10554/8434>
- Cullimore, R. (2000) Practical atlas for Bacterial Identification. USA.
- De la Rosa, M.(2002) El aire: hábitat y medio de transmisión de microorganismos. Observatorio Medioambiental. Vol. 5. Disponible en: [ecob,+OBMD0202110375A.PDF.pdf](#)
- Diccionario médico de la Universidad de Navarra (2022) *Bacillus*. Disponible en: [Bacillus. Diccionario médico. Clínica Universidad de Navarra. \(cun.es\)](#)
- Domínguez, K., Soria, R., Sistos, A., Molano, D. & Hernández, J. (2013) Tinción DOMS. Técnica para teñir bacilos esporulados de interés médico. Disponible en: [MEDLAB 2013 5-1.pdf \(pacal.org\)](#)
- Elsevier, C. (2011) Clasificación, estructura y replicación de las bacterias. Disponible en: [Clasificación, estructura y replicación de las bacterias \(elsevier.com\)](#)
- Fernández, A., García, C., Sáez, J. & Valdezate, S. (2010) Procedimientos en Microbiología Clínica. Documento Científico. SEIMC. Disponible en: [Procedimientos en Microbiología Clínica \(seimc.org\)](#)
- Fordtran, J. (2006) Colitis Due to *Clostridium Difficile* Toxins: Underdiagnosed, Highly Virulent, and Nosocomial, Baylor University Medical Center Proceedings, 19:1, 3-12, <https://doi.org/10.1080/08998280.2006.11928114>
- Ganador, Sitio Oficial. (2023) Ingredientes, análisis y guía de alimentación. Disponible en: [Ganador® Croqueta | Ganador® adulto razas pequeñas](#)
- García, A. & Zamudio, M. (1998) Manual Microbiología Médica. UNAM, FES Zaragoza.
- Gómez, K. (2019) Prueba de hidrólisis de gelatina. Disponible en: [PRUEBA DE HIDROLISIS DE GELATINA | Ciencias de la Salud \(cienciasdelasaludnic.blogspot.com\)](#)
- González-León, Liane Mary, Rizo Porro, Mariela, & Arenal Cruz, Amílcar. (2022). *Bacillus firmus*: aplicaciones y potencialidades como probiótico en la acuicultura. *Revista de Producción Animal*, 34(2), 1-12. Epub 30 de agosto de 2022. Recuperado en 29 de mayo de 2023, de

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-79202022000200001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202022000200001&lng=es&tlng=es).

- Gorgoroso, F. (2012) Caracterización fenotípica y genotípica de asilamientos pertenecientes al grupo *Bacillus subtilis*. Tesis. Universidad de la República de Uruguay. Disponible en: [tesis ferFINAL10ABRIL \(udelar.edu.uy\)](https://tesis.ferFINAL10ABRIL.udelar.edu.uy)
- Gutiérrez, E. & Menéndez, F. (1980) Aislamiento e identificación de *Bacillus cereus* en alimentos deshidratados. UNAM. Tesis digital. Disponible en: [Tesis Digital](#)
- Hernández, D. (2023) ¿Exponer la proteína en polvo al calor genera algún riesgo? UNIVA. Disponible en: ¿Exponer la proteína en polvo al calor genera algún riesgo? - La Piedad (univa.mx)
- Hernández, G. (2002) "Manual de bacteriología diagnóstica". UNAM. Tesis digital. Disponible en: [Tesis Digital](#)
- Jañez, E. (1998) Curso de Microbiología General. Argentina. Disponible en: [Endosporas y otras diferenciaciones \(biologia.edu.ar\)](#)
- Lagunas, J., Zavaleta, E., Osada, S., Aranda, S., Luna, I., & Vaquera, H. (2001). *Bacillus firmus* como Agente de Control Biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Mexicana de Fitopatología, 19(1),57- 65.[fecha de Consulta 13 de Abril de 2023]. ISSN. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219108>
- Lippincott, W. & Wilkins, I. (2000) Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3era Edición. Estados Unidos.
- Logan, N.A. and Vos, P.D. (2015). *Bacillus*. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
- López, S. (2020) *Bacillus* un género que alberga especies que cumplen diversos roles biológicos. UNLP. Disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/lic\\_lopez\\_bacillus.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/lic_lopez_bacillus.pdf)
- McKee, T. & McKee, J. (2023) Bioquímica. Las bases moleculares de la vida. 5e. McGraw-Hill. Disponible en: Metabolismo aerobio I: ciclo del ácido cítrico |

Bioquímica. Las bases moleculares de la vida, 5e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical (mhmedical.com)

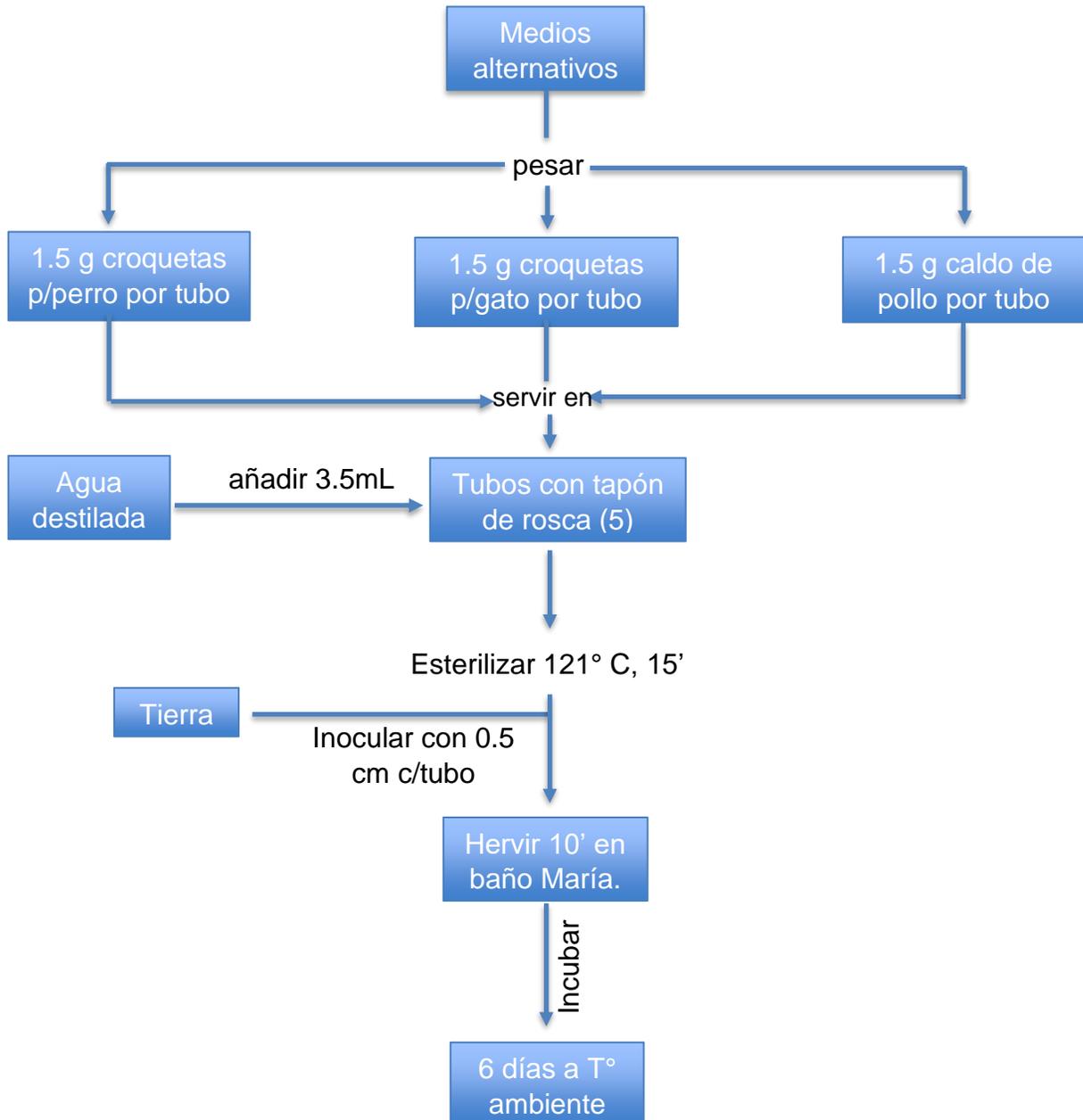
- MD, T. (2019) *Escherichia coli* (*E. coli*) Infections Workup. Disponible en: [Escherichia coli \(E coli\) Infections Workup: Laboratory Studies, Imaging Studies, Other Tests \(medscape.com\)](#)
- Microbe-canvas (2023) Bacterias Grampositivas. *B. subtilis*. Disponible en: [Bacillus subtilis \(microbe-canvas.com\)](#)
- Molina, J. (2015) Microbiología, Bacteriología y Virología. 2ª edición. México. Edición digital. Disponible en: [Bookshelf Online - Ref: Microbiología, Bacteriología y Virología \(vitalsource.com\)](#)
- Mu, Y & Cong, Y. (2019) *Bacillus coagulans and its applications in medicine*. Benef Microbes.;10(6):679-688. doi: 10.3920/BM2019.0016. Disponible en: [BACILLUS COAGULANS Y SUS APLICACIONES EN MEDICINA \(smimport.com\)](#)
- OMS. (2022) Peligros biológicos. Disponible en: [OPS/OMS | Peligros biológicos \(paho.org\)](#)
- Prescott, L. (2002) Microbiología. McGraw-Hill. España. Libro digital. 5ta Edición. Disponible en: [ProQuest Ebook Central - Reader](#)
- Pruneda, A. (2023) ¿De qué están hechas las croquetas para perro? Disponible en: [de qué están hechas las croquetas para perro \(cocinadelirante.com\)](#)
- Rocha, N. (2021) Croquetas para gato más recomendadas. Disponible en: [Blog de Claro Shop Un espacio donde encuentras ideas, tendencias y noticias para hacer mejores compras Estas son las croquetas para gato más recomendadas](#)
- Rodríguez, A. (2021) Woese y “las arqueas”, un nuevo dominio. Disponible en: [Woese y "las arqueas": un nuevo dominio... - Visto de Otro Lado](#)
- Sarmiento, L.; López, M.; Maldonado, I. & Quiroz, F. (2022) Production of indole-3-acetic acid by *Bacillus circulans* E9 in a low-cost medium in a bioreactor. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2022.03.007>
- Science, Q. (2022) Disponible en: [Cómo hacer placas de agar con leche desnatada \(scienceaq.com\)](#)
- Silva, M. (2013) Manual de bacteriología. UNAM. Tesis digital. Disponible en: [Tesis Digital](#)

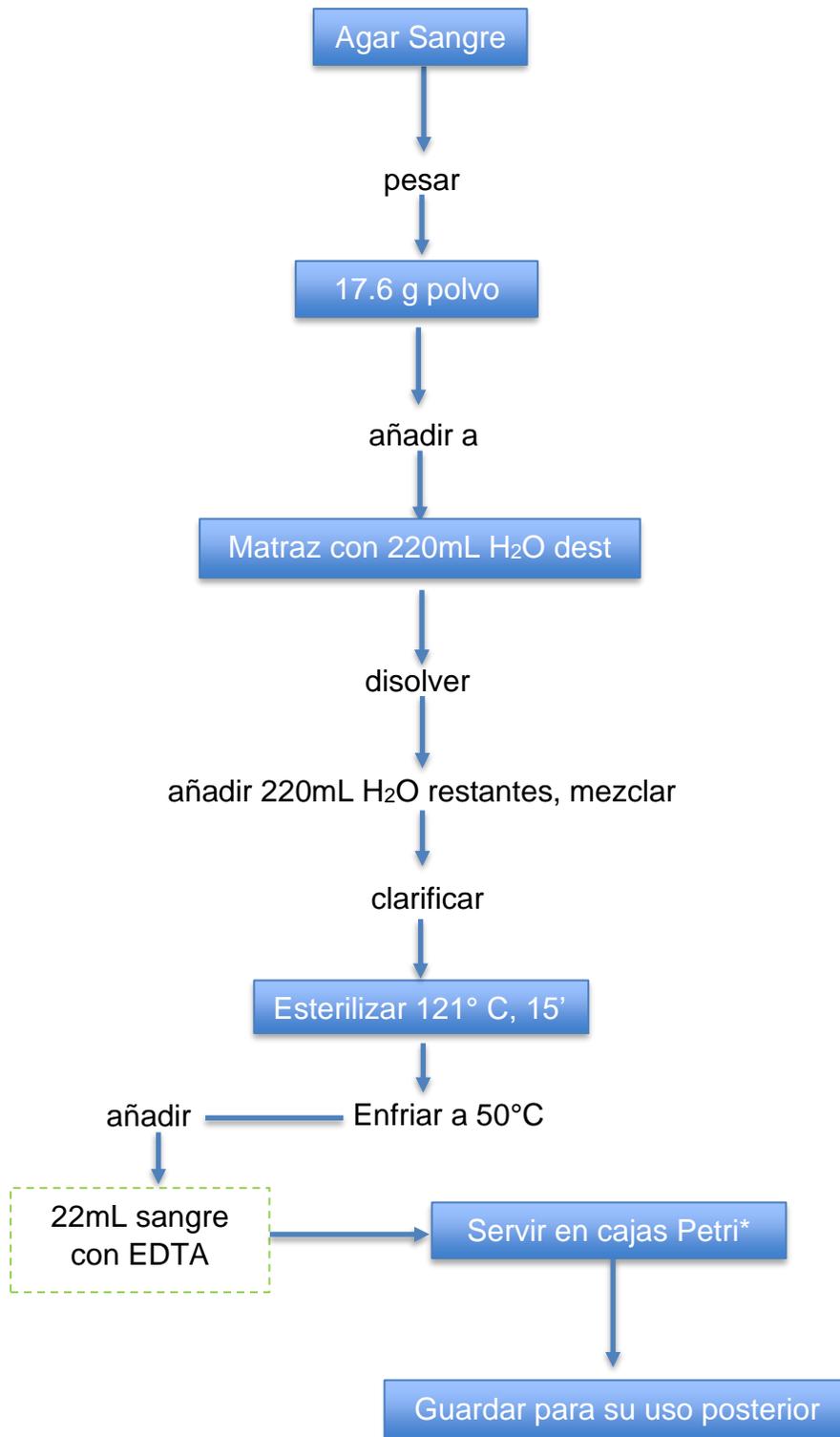
- Slideshare, (2013) Lecitinasa. Disponible en: [Lecitinasa \(slideshare.net\)](https://www.slideshare.net)
- Sosa, A., Pazos Álvarez, V., Torres, D. & Casadesús, L. (2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc.. *Fitosanidad*, 15(1), 39-44. Recuperado en 08 de mayo de 2023, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1562-30092011000100006&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092011000100006&lng=es&tlng=es).
- Soto, A. (2019) Medios de Cultivo. Portal EduLabC. Disponible en: [Medios de cultivo - EduLabC](#)
- Tamez, L. (2013) “Compendio de pruebas para la identificación de bacterias de importancia clínica aplicada a la docencia para la asignatura de bacteriología (licenciatura en bioquímica diagnóstica)”, UNAM. Tesis digital. Disponible en: [Tesis Digital](#)
- Tortoló-Cabañas, K. y Bell-García, A. (2015). Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*: estado del arte. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 49(1),22-26. [fecha de Consulta 29 de Mayo de 2023]. ISSN: 0138-6204. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223136961004>
- Tortora, G. (2017) Introducción a la microbiología. 12ª ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Medica Panamericana. Libro digital. Disponible en: [Introducción a la Microbiología \(unam.mx\)](#)
- ULPGC (2022) Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias. Disponible en: [Microsoft Word - Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias.doc \(ulpgc.es\)](#)
- UNICACH, (2014) *Bacillus megaterium* CGEN 003. IPN. Disponible en: [Bacillus megaterium CGEN 003 | Cepario Unicach \(wordpress.com\)](#)
- Unilever, Sitio Oficial. (2022) Knorr, Pasión por las verduras. Disponible en: [Knorr ES | Knorr ES](#)
- Vélez, J., Montalvo, M. & Velarde, G. (2017) Fisiología, bioquímica y metabolismo del ácido láctico: revisión de la literatura. Universidad Central del Ecuador. Disponible en: [metro-junio-out-2017-1-25-29.pdf \(bvsalud.org\)](#)

- Versalovic, J. (2011) Manual of Clinical Microbiology 10th Edition. Disponible en: [Bacillus circulans \(microbe-canvas.com\)](http://microbe-canvas.com)
- Villalba, V. (2017) "Revisión y actualización del manual de prácticas de laboratorio de microbiología general para la licenciatura de Bioquímica Diagnóstica". UNAM. Tesis digital.

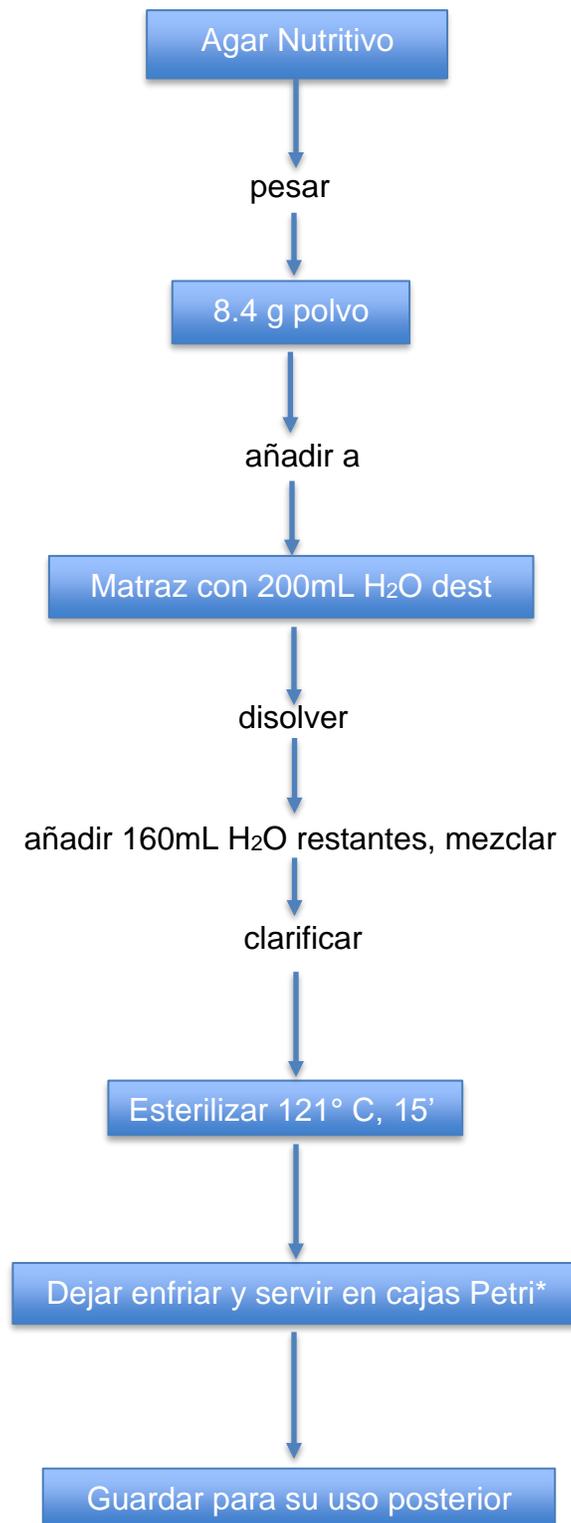
## 11. ANEXOS

### 11.1 Diagramas de preparación de medios alternativos, medios de cultivo y pruebas bioquímicas

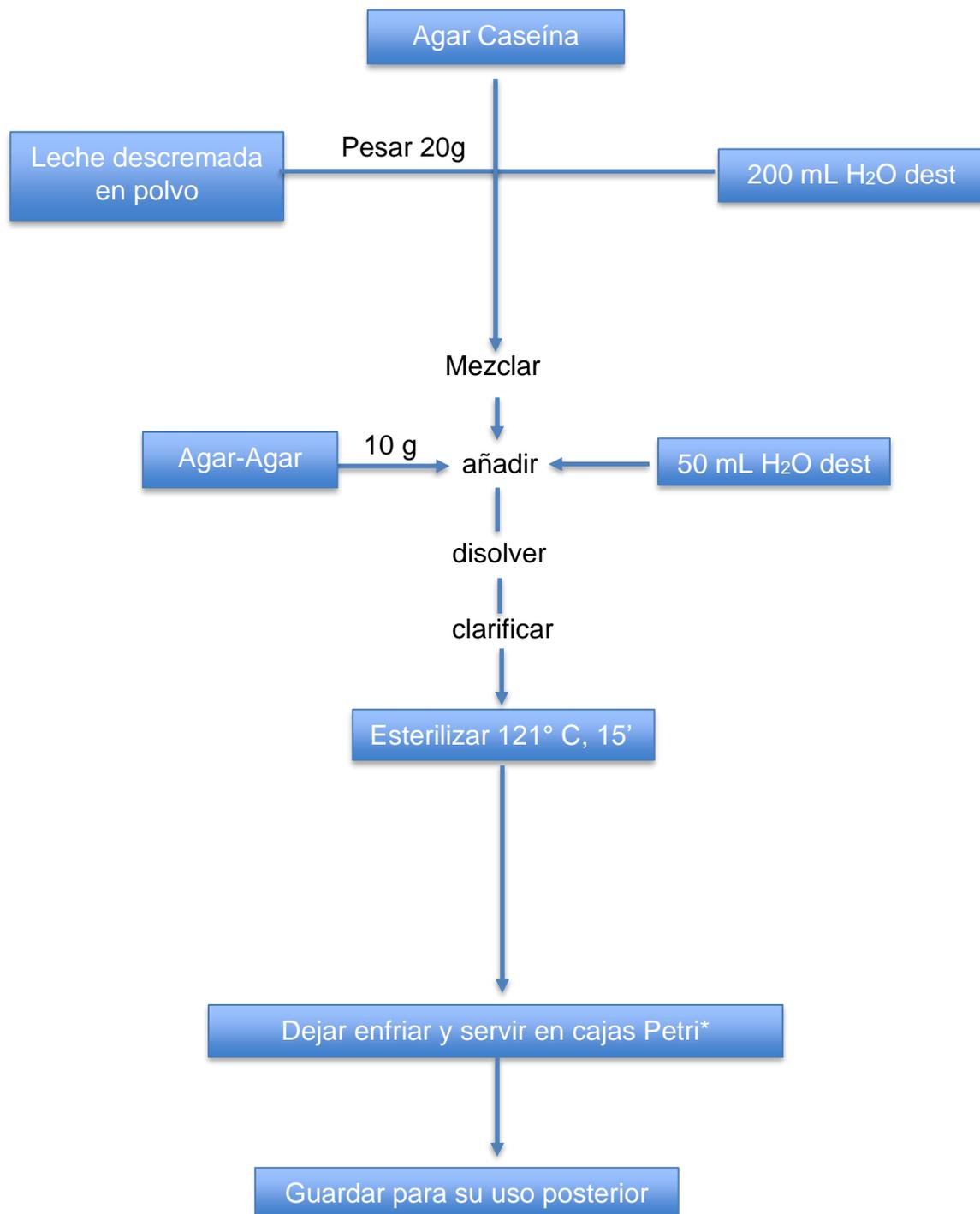




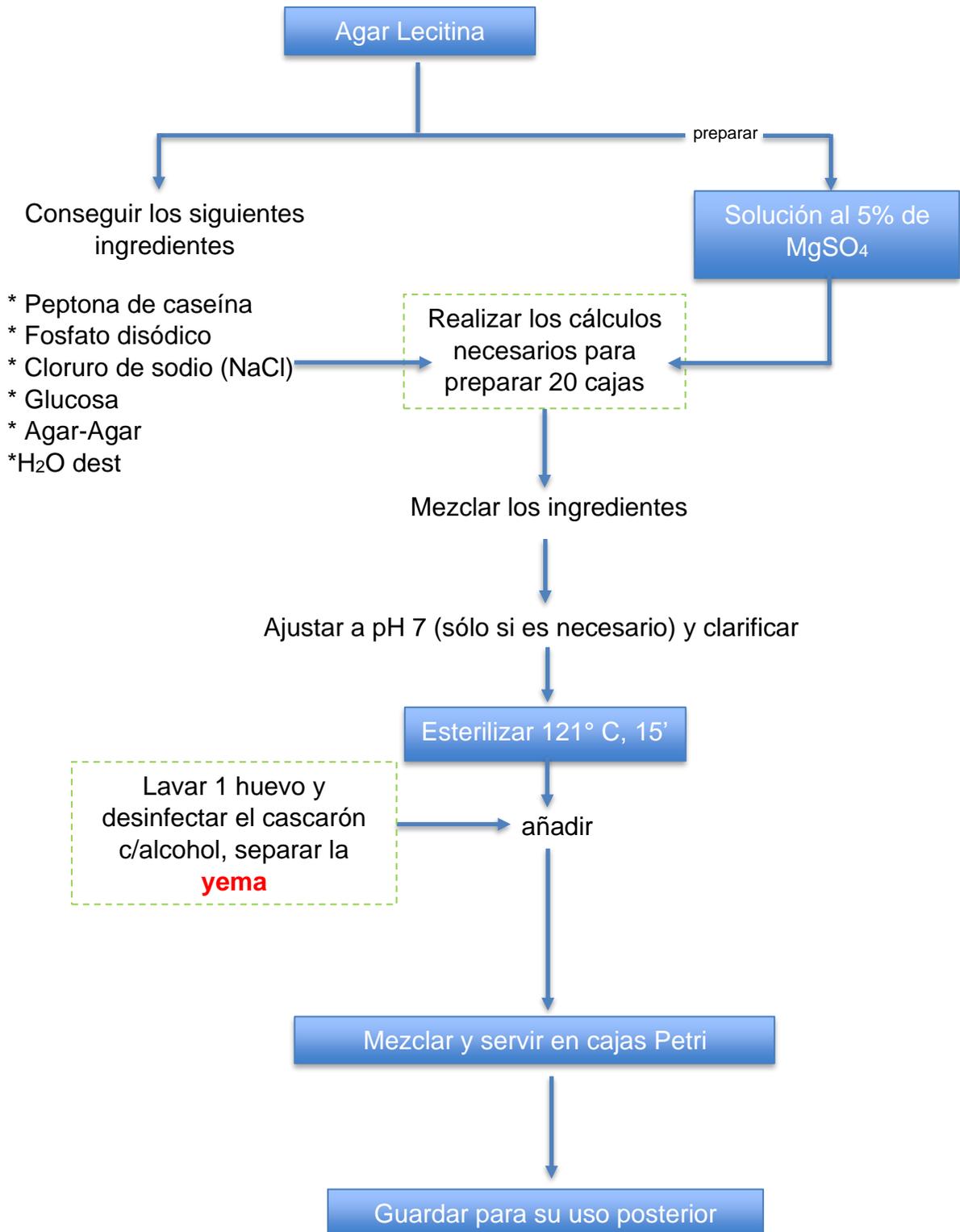
\* Los gramos y mililitros a utilizar son para 20 cajas chicas y excedente

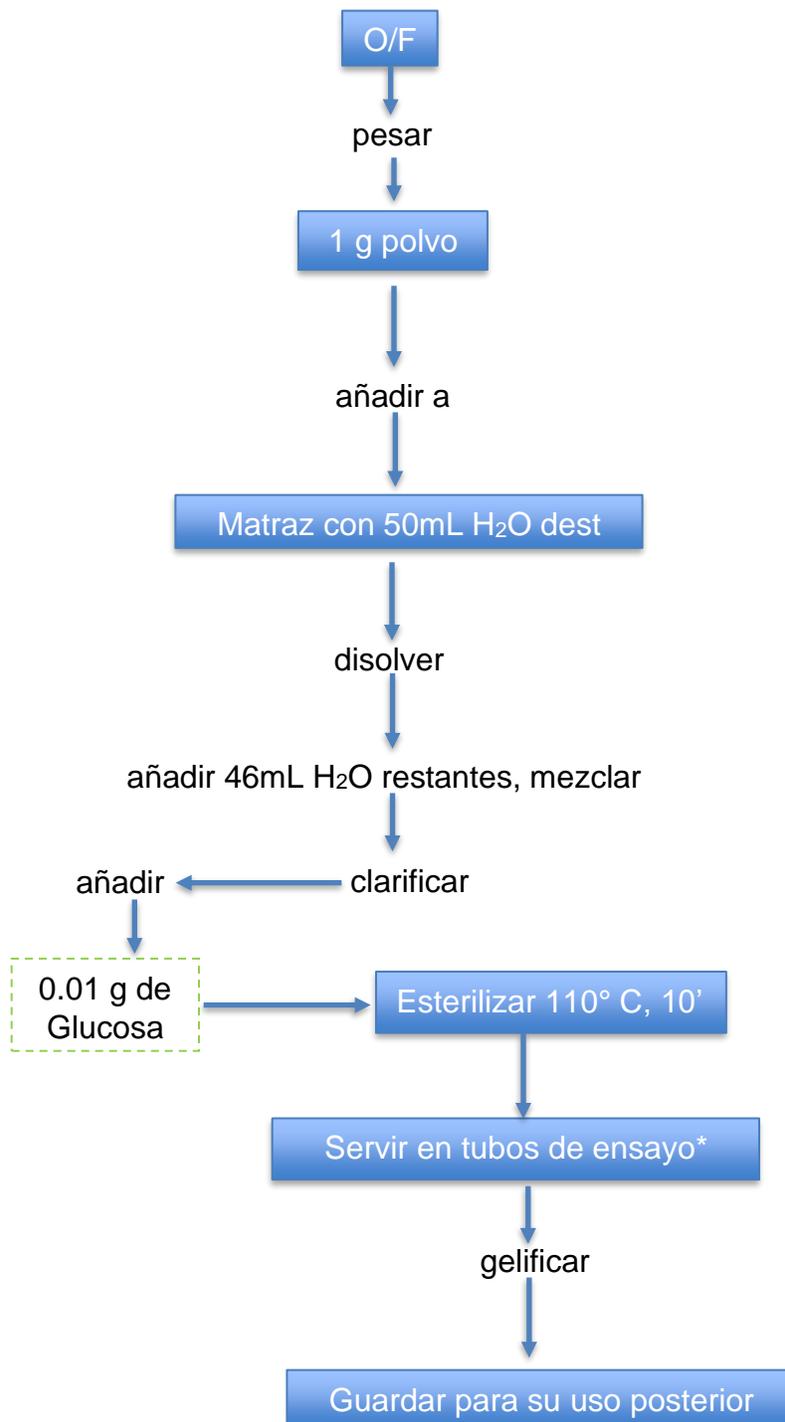


\* Los gramos y mililitros a utilizar son para 20 cajas chicas y excedente

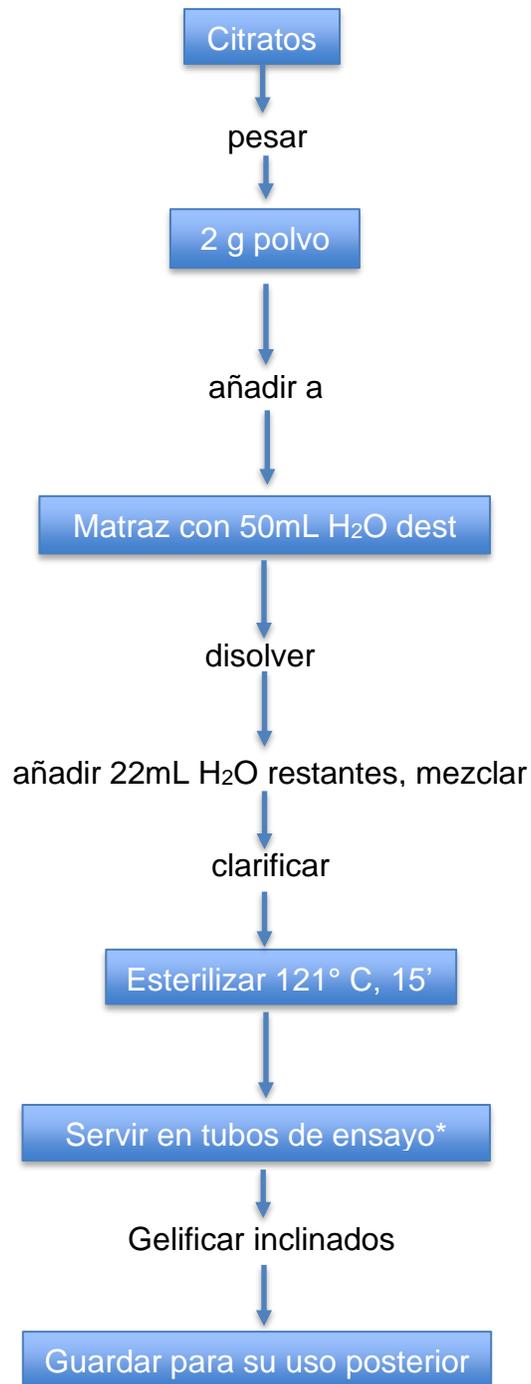


\* Los gramos y mililitros a utilizar son para 20 cajas chicas y excedente

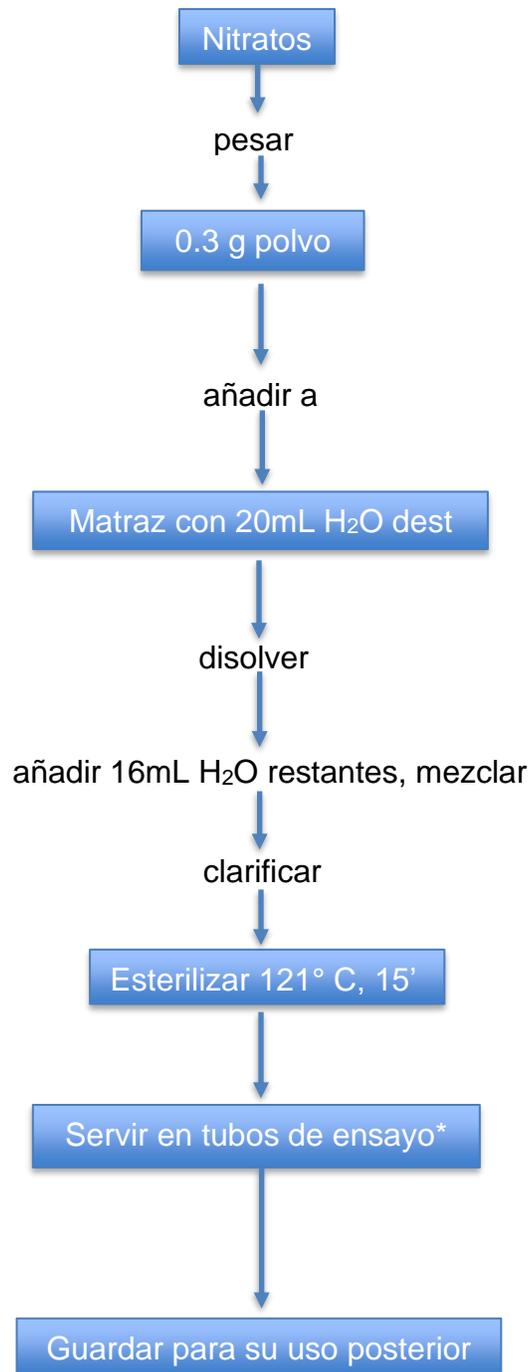




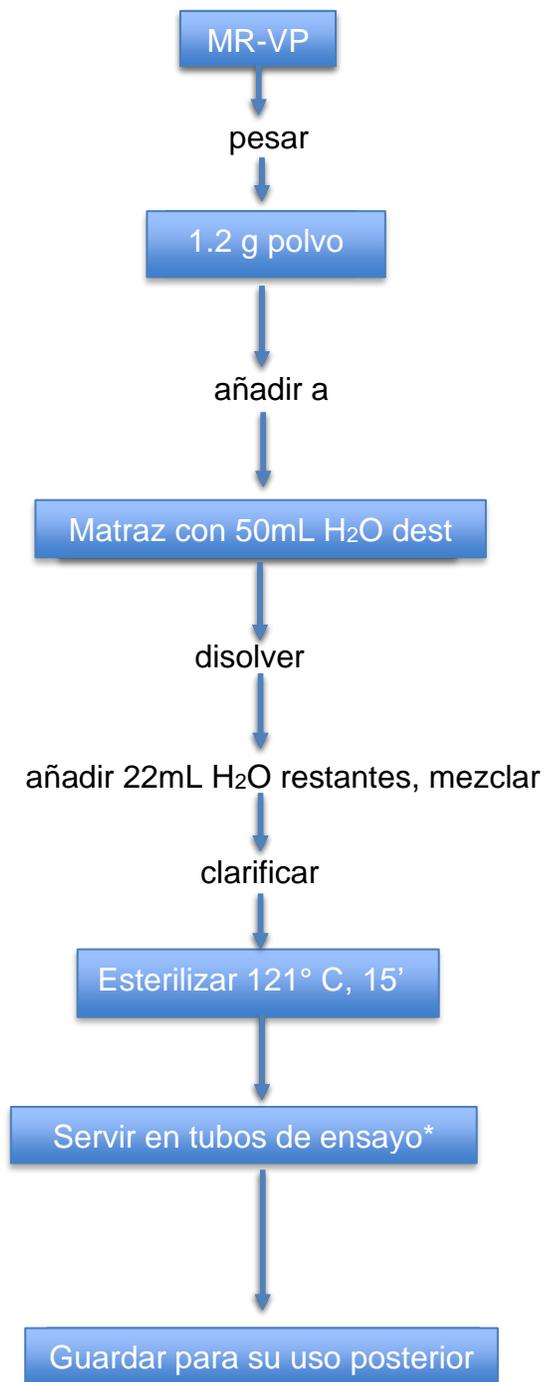
\* Los gramos y mililitros a utilizar son para 40 tubos y excedente



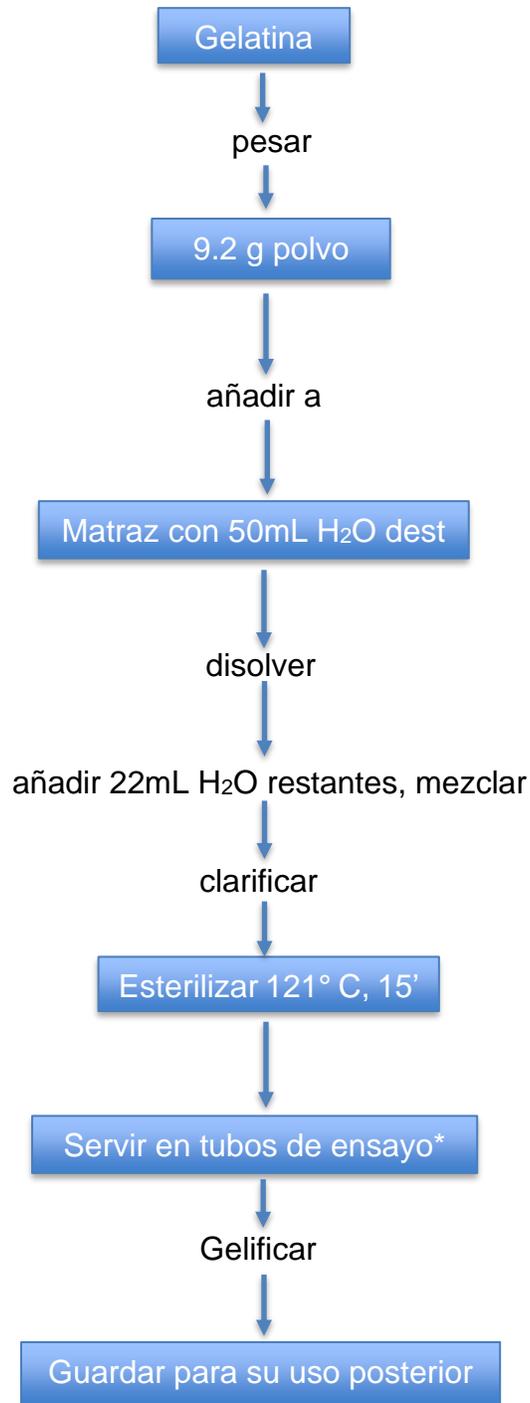
\* Los gramos y mililitros a utilizar son para 20 tubos y excedente



\* Los gramos y mililitros a utilizar son para 20 tubos y excedente

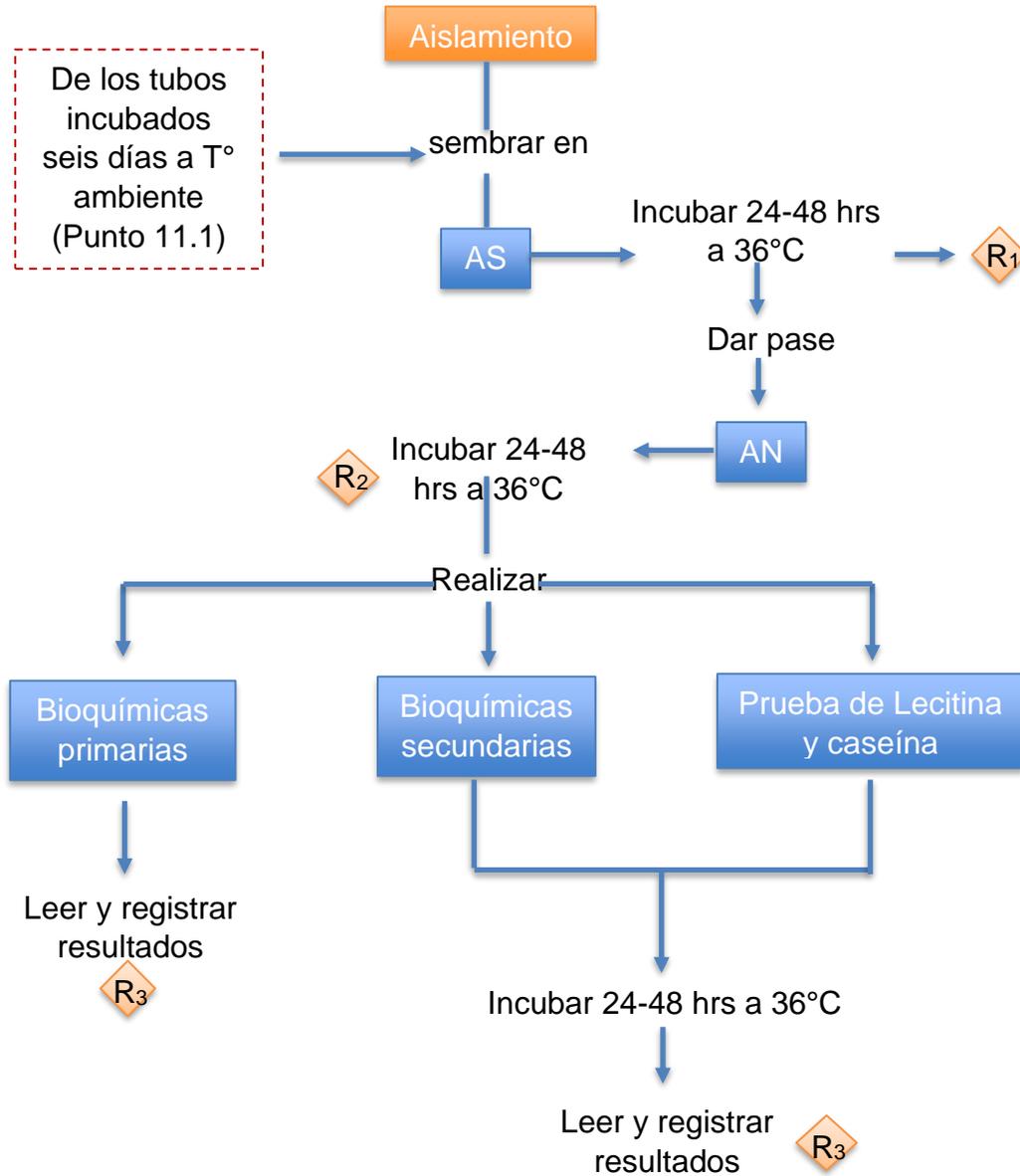


\* Los gramos y mililitros a utilizar son para 20 tubos y excedente



\* Los gramos y mililitros a utilizar son para 20 tubos y excedente

## 11.2. Aislamiento e identificación bacteriana

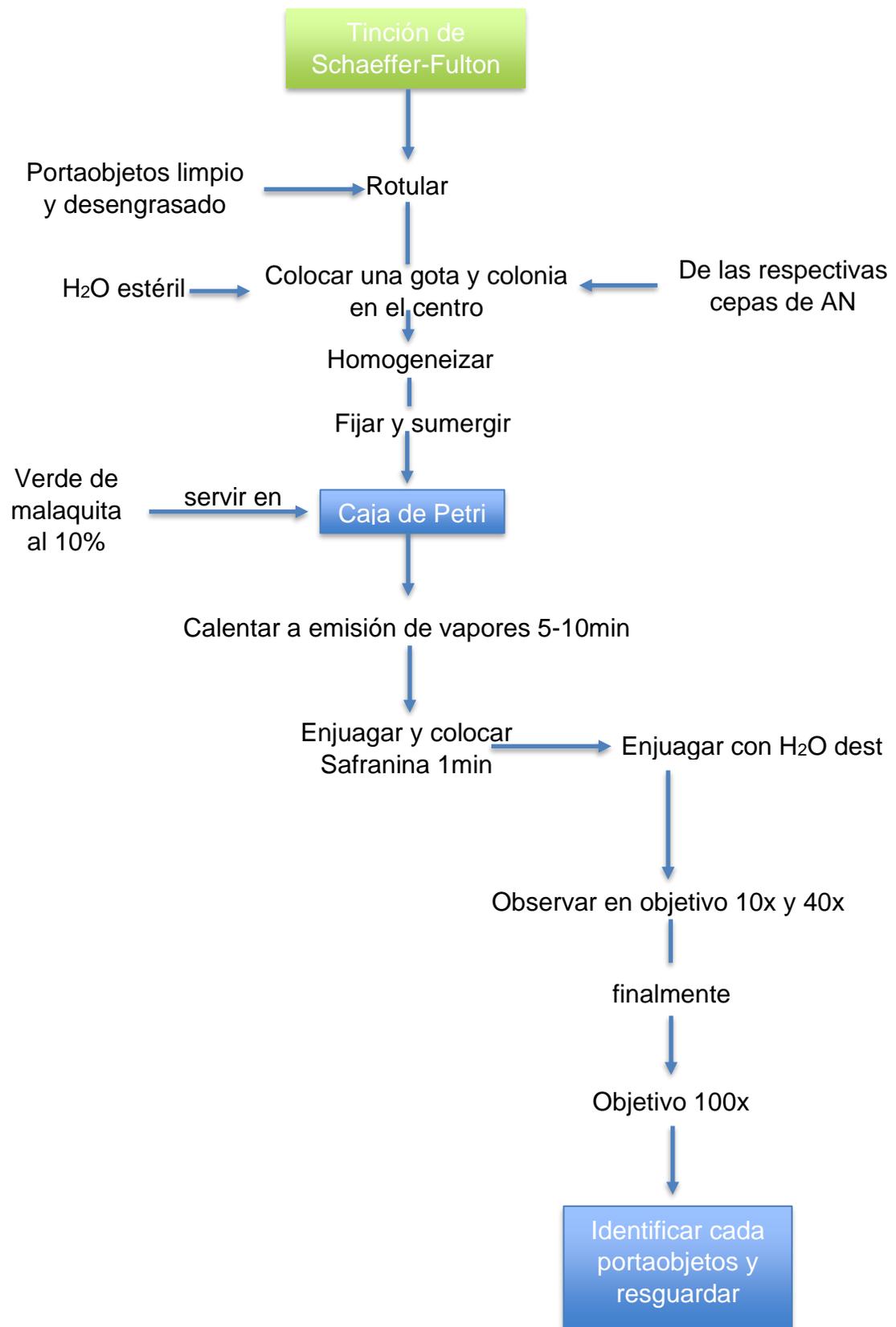


R<sub>1</sub>= Inactivar y desechar en basura municipal.

R<sub>2</sub>= Identificar y guardar en el refrigerador.

R<sub>3</sub>= Leer, inactivar, dejar remojando 24hrs en cloro con jabón y lavar y/o desechar en basura municipal.

### 11.3. Identificación bacteriana mediante tinción de esporas



## 11.4 Siglas y abreviaturas

Sigla/Abreviatura	Significado
<b>H<sub>2</sub>O dest</b>	Agua destilada
<b>FES-C</b>	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
<b>CM</b>	Cooked Meat
<b>Var<sub>1</sub></b>	Variante uno
<b>Var<sub>2</sub></b>	Variante dos
<b>Var<sub>3</sub></b>	Variante tres
<b>AS</b>	Agar Sangre
<b>AN</b>	Agar Nutritivo
<b>T°</b>	Temperatura
<b>S-F</b>	Schaeffer-Fulton
<b>ATP</b>	Adenosín Trifosfato
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno molecular
<b>NO<sub>3</sub></b>	Nitratos
<b>O/F</b>	Óxido-Fermentación
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>Zn</b>	Zinc
<b>MR</b>	Rojo de metilo
<b>VP</b>	Vogues-Proskauer
<b>KOH</b>	Hidróxido de Potasio
<b>VM</b>	Verde de Malaquita
<b>g</b>	Gramos
<b>mL</b>	Mililitros