



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO. División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Formato SS-T

## SOLICITUD DE TÉRMINO DE SERVICIO SOCIAL

Mtra. María Elena Contreras Garfias  
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

### Datos del Alumno

Nombre : Aranzha Quiroz Langarica	
Matrícula : 2143024151	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica <input type="checkbox"/>
Domicilio : Bernardino de Sahagun #6, Circuito Historiadores, Ciudad Satelite, Naucalpan de Juarez	
Teléfono : 55-62-40-29	Celular : 55-41-11-19-66
Correo Electrónico : aranzha996@gmail.com	CURP : QULA960722MDFRNR09

### Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y PRESERVACIÓN DE ENTEROBACTERIAS DEL CEPARIO DE INVESTIGACIÓN DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL DE LA UAM-X	
Lugar donde se realizó el Servicio Social : UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO, LABORATORIO DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL N-101	
Dependencia :	
Entidad Federativa : Distrito Federal	
Municipio : Coyoacán	Localidad : Villa Quietud
Fecha de Inicio	Fecha de Término
Día 27 Mes 9 Año 2019	Día 27 Mes 3 Año 2020
<b>PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES</b>	
Sector: 1.- Educativo <input type="checkbox"/>	Tipo: 2.- Interno <input type="checkbox"/>
Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición <input type="checkbox"/>	

### FIRMAS

Dra. Ana Laura Esquivel Campos No. Econ. 33148

Asesor Interno  
Nombre, firma y No. Económico

Aranzha Quiroz Langarica

Alumno  
Nombre, firma

M. en.C. Miguel Angel Mosqueda Cuatrecasas No. Econ. 22011

Asesor Externo  
Nombre, firma y No. Económico

M. en C. Felipe Mendoza Pérez

Vo. Bo. de la Comisión  
Nombre y firma de la persona que autoriza



Casa abierta al tiempo

Ciudad de México, 13 de enero del 2021

**CDE Patricia Enzaldo de la Cruz.**  
COORDINADORA DE SERVICIO SOCIAL DE LA DCBS  
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Por medio de la presente me permito comunicarle que la alumna **QUIROZ LANGARICA ARANZHA** de Licenciatura en **Química Farmacéutica Biológica** con matrícula **2143024151**, quien registró el proyecto de servicio social “**Expresión del gen ACTB en gónadas de Millerichthys Robustus durante la madurez sexual**”. Del 27 de septiembre de 2019 al 27 de marzo del 2020 cubriendo un total de 480 horas. Por falta de la infraestructura necesaria para la realización del proyecto antes mencionado, se decidió cambiar el tema del proyecto a “**Identificación, aislamiento y preservación de enterobacterias del cepario de investigación del laboratorio de Biología Experimental de la UAM-X**”.

ATENTAMENTE

**Dra. Ana Laura Esquivel Campos**  
No. Econ. 33148  
Departamento de Sistemas biológicos UAM-X  
**Asesora Interna**

**M. en C. Miguel Ángel Mosqueda Cabrera**  
No. Econ. 22011  
Departamento hombre y su ambiente UAM-X  
**Asesor Interno**

**Aranzha Quiroz Langarica**  
Matrícula: 2143024151



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Xochimilco

NOMBRAMIENTO DE ASESOR  
31 de octubre del 2019

CSS/DCBS/I-418/2019

**Q.F.B. ANA LAURA ESQUIVEL CAMPOS**  
**PROFESORA-INVESTIGADORA**  
Presente

Informo a usted que con base en el artículo 17 y 18 del Reglamento de Servicio Social a Nivel Licenciatura de la UAM, ha sido designada asesora responsable de **ARANZHA QUIROZ LANGARICA**, con matrícula **2143024151** de la licenciatura en **QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGICA**, para que bajo su supervisión y aprobación, evalúe el cumplimiento de ésta prestación que se llevará a cabo a partir del **27 de Septiembre de 2019** al **27 de Marzo de 2020** en **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD XOCHIMILCO**, con clave y denominación:

**EXPRESION DEL GEN ACTB EN GONADAS DE MILLERICHTHYS ROBUSTUS DURANTE LA MADUREZ SEXUAL**

Le agradeceré que con base en este nombramiento y bajo su aprobación, se cumplan los requerimientos y objetivos propuestos del proyecto y se entregue el informe final, establecido en el artículo 29 del Reglamento citado, de las actividades realizadas por el prestador.

Sin otro particular, agradezco su atención.

**Atentamente**  
**Casa abierta al tiempo**

  
**MTRA. MARIA ELENA CONTRERAS GARFIAS**  
**DIRECTORA DE LA DIVISIÓN**



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Xochimilco

NOMBRAMIENTO DE ASESOR  
31 de octubre del 2019

CSS/DCBS/I-418/2019

**M. EN C. MIGUEL ANGEL MOSQUEDA CABRERA**  
**PROFESOR-INVESTIGADOR**  
Presente

Informo a usted que con base en el artículo 17 y 18 del Reglamento de Servicio Social a Nivel Licenciatura de la UAM, ha sido designado asesor responsable de **ARANZHA QUIROZ LANGARICA**, con matrícula **2143024151** de la licenciatura en **QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGICA**, para que bajo su supervisión y aprobación, evalúe el cumplimiento de ésta prestación que se llevará a cabo a partir del **27 de Septiembre de 2019** al **27 de Marzo de 2020** en **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD XOCHIMILCO**, con clave y denominación:

**EXPRESION DEL GEN ACTB EN GONADAS DE MILLERICHTHYS ROBUSTUS DURANTE LA MADUREZ SEXUAL**

Le agradeceré que con base en este nombramiento y bajo su aprobación, se cumplan los requerimientos y objetivos propuestos del proyecto y se entregue el informe final, establecido en el artículo 29 del Reglamento citado, de las actividades realizadas por el prestador.

Sin otro particular, agradezco su atención.

**Atentamente**  
**Casa abierta al tiempo**

  
**MTRA. MARIA ELENA CONTRERAS GARFIAS**  
**DIRECTORA DE LA DIVISIÓN**



Ciudad de México, 13 de enero del 2021

**Mtra. María Elena Contreras Garfias**  
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
DIRECTOR

Por este conducto hago de su conocimiento que la alumna **QUIROZ LANGARICA ARANZHA**, matrícula **-2143024151-** ha cumplido en tiempo y forma de los objetivos propuestos en el proyecto de servicio social titulado **"AISLAMIENTO Y PRESERVACIÓN DE ENTEROBACTERIAS DEL CEPARIO DE INVESTIGACIÓN DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL DE LA UAM-X"** de la carrera de Química Farmacéutica Biológica de esta Unidad. Dicho proyecto se llevó a cabo del 27 de septiembre de 2019 al 27 de marzo del 2020.

Sin más por el momento aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo, quedando de Ud.

Atentamente,  
"CASA ABIERTA AL TIEMPO"

---

Dra. Ana Laura Esquivel Campos  
No. Ec. 33148



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

Ciudad de México, 03 de febrero de 2021

**Mtra. María Elena Contreras Garfias**  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Directora

Presente:

Por este conducto hago de su conocimiento que la alumna QUIROZ LANGARICA ARANZHA, matrícula -2143024151- ha cumplido en tiempo y forma de los objetivos propuestos en el proyecto de servicio social titulado "AISLAMIENTO Y PRESERVACION DE ENTEROBACTERIAS DEL CEPERARIO DE INVESTIGACIÓN DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL DE LA UAM-X" de la carrera de Química Farmacéutica Biológica de esta Unidad. Dicho proyecto se llevó a cabo del 27 de septiembre del 2019 al 27 de marzo del 2020.

Sin más por el momento y en espera de verme favorecido con la atención que se sirva prestar a la presente, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo,

Atentamente,  
"CASA ABIERTA AL TIEMPO"

---

**M. en C. Miguel Ángel Mosqueda Cabrera**  
zitzitl@correo.xoc.uam.mx

---

**DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE**

Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, C.P. 04960, Delegación Coyoacán, México, D.F. Tels. 5483-7220 y 5594-6532; Fax. 5483-7469.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

---

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS  
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

REGISTRO DEL SERVICIO SOCIAL

## **Título**

IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y PRESERVACIÓN DE ENTEROBACTERIAS DEL CEPARIO  
DE INVESTIGACIÓN DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL DE LA UAM-X

QUE PRESENTA LA ALUMNA  
QUIROZ LANGARICA ARANZHA MATRÍCULA 2143024151

### **ASESORES**

DRA. ANA LAURA ESQUIVEL CAMPOS  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS. NÚM. ECO. 33148

M. EN C. MIGUEL ÁNGEL MOSQUEDA CABRERA  
DEPARTAMENTO HOMBRE Y SU AMBIENTE NÚM. ECO. 22011

México, CDMX octubre 2020

## INDICE

	PÁGINA
Introducción	3
Marco Teórico	4
<i>Escherichia coli</i>	5
<i>Salmonella typhimurium</i>	5
<i>Shigella (flexneri y dysenteriae)</i>	6
Medios De Cultivo Selectivos Y No Selectivos	6
Pruebas Bioquímicas	9
Tinción De Gram	12
Criopreservación	13
Justificación	14
Objetivos	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
Metodología	15
Proliferación Bacteriana	15
Aislamiento Bacteriano	15
Identificación Metabólica	16
Identificación Microscópica	16
Criopreservación	16
Resultados	17
Descripción Macroscópica	17
Evaluación Microscópica	18
Evaluación Metabólica	18
Discusión	19
Conclusión	22
Referencias	23
Fichas Técnicas	25
Resumen	26

## RESUMEN

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos (BGN) con importancia clínica; producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano, mismas que dependiendo de su propiedades morfológicas y metabólicas se pueden identificar, aislar y preservar en un espacio controlado como el Laboratorio de Biología Experimental de la UAM-X.

A continuación se presenta un estudio descriptivo del procedimiento de identificación, aislamiento y preservación de enterobacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* o *Shigella*, proliferadas en medio BHI facilitando su crecimiento, con distintos medios de cultivo selectivos para cada cepa y baterías de pruebas bioquímicas se determinó la identidad de cada bacteria, observando sus características morfológicas, microscópicas y metabólicas, concluyendo que cada cepa aislada mostraba resultados concordantes con la literatura citada, se criopreservaron para futuras investigaciones.

## INTRODUCCIÓN

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos (BGN) con importancia clínica; producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano. Desde el punto de vista clínico, se pueden clasificar en dos grupos, enterobacterias patógenas primarias (*Salmonella enterica*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.* y algunas cepas de *Escherichia coli*) que producen principalmente cuadros gastrointestinales y enterobacterias oportunistas (Guerrero, et al., 2014). Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* crecen fácilmente en los medios de cultivo, tanto no selectivos (por ejemplo, agar sangre y agar chocolate, útiles en muestras generalmente estériles) como selectivos (empleados para sembrar muestras que suelen estar contaminadas por otros microorganismos como es el caso de los medios para la recuperación de *Salmonella* o *Shigella* en muestras de heces). El diagnóstico de las cepas de *E. coli* responsables de gastroenteritis se suele realizar en laboratorios de referencia. La identificación de

las diferentes especies suele realizarse mediante sistemas de pruebas bioquímicas (Guerrero et al., 2014).

Se observaron distintas características macroscópicas, microscópicas y metabólicas para cada una de las especies en el estudio en diferentes medios de cultivo selectivos, se preservaron de manera específica evitando una contaminación cruzada, otorgando cepas debidamente identificadas para trabajo al cepario del laboratorio N-101 el cual cumple con la función de un reservorio genético de especies para futuros proyectos.

## **MARCO TEÓRICO**

Las enterobacterias son una familia heterogénea y amplia de bacilos Gram negativos que residen en el colon del hombre sin causar enfermedad aunque con frecuencia son causantes de un número considerable de infecciones, tanto en pacientes con inmunidad conservada como en inmunodeprimidos ya que en el paciente hospitalizado las enterobacterias colonizan el tubo digestivo, la orofaringe, el aparato genitourinario y la piel mientras que en el ambiente hospitalario pueden aislarse del agua, catéteres, sondas, sueros, antisépticos, equipos de respiración mecánica, etc., nichos ambientales con los que pueden entrar en contacto los pacientes hospitalizados y debido a su ubicuidad dentro y fuera del cuerpo a menudo causan infecciones oportunistas, siendo causa frecuente de infecciones nosocomiales (Navarro et al., 2010).

Las enfermedades infecciosas han influido de forma determinante en la evolución de la historia del hombre y son actualmente la principal causa de morbimortalidad en el mundo a pesar del descubrimiento de cientos de agentes antimicrobianos cada vez más potentes y efectivos. La familia *Enterobacteriaceae* consta de varios géneros: *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter* (Alcaráz et al., 2017).

### ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza principalmente el intestino del ser humano pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez et al., 2002). Dependiendo de su toxicidad esta bacteria se puede clasificar en 6 tipos, los cuales pueden ser enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC). Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. La infección por *E. coli* se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda. Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta, también pueden aparecer fiebre y vómitos. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte (Rodríguez et al., 2002).

### ***Salmonella typhimurium***

Es una bacteria del tipo bacilo, Gram negativa, flagelada, cuyo nombre completo es *Salmonella enterica* subespecie *entericasero* variedad *typhimurium*. Es un organismo unicelular flagelado anaerobio facultativo, causante de la enfermedad conocida como salmonelosis, enfermedad que ataca tanto a humanos como a otras especies animales. Sigue su ciclo de vida en distintos hospederos animales, reproduciéndose por bipartición en el intestino delgado, en su proceso de vida en el intestino genera toxinas que provocan diarreas, junto con las heces salen las bacterias contaminando así diversas superficies. Ingresa al organismo si se consumen alimentos contaminados o si se tiene contacto con superficies contaminadas y luego se llevan las manos a la boca, la bacteria ingresa al sistema digestivo, dentro del intestino delgado, las bacterias se adhieren a la membrana

celular de las células de la mucosa epitelial. Entonces, penetran en las células y causan daños metabólicos y estructurales. Los daños causados por las toxinas de la bacteria generan gastroenteritis o inflamación de la membrana interna del intestino. La enfermedad se manifiesta con diarreas, vómitos y dolores abdominales. Esta enfermedad no llega a ser mortal salvo en casos de personas ancianas, niños o quienes tienen deprimido el sistema inmunológico (Figueroa et al., 2005).

### ***Shigella (flexneri y dysenteriae)***

*Shigella* es un bacilo gramnegativo, pequeño, inmóvil, no encapsulado, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Se clasifica en 4 grupos, A, B, C y D que corresponden a *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*), *Shigella flexneri* (*S. flexneri*), *Shigella boydii* y *Shigella sonnei* (*S. sonnei*), respectivamente. Los cuadros más graves de shigelosis se deben a *S. dysenteriae* del serotipo, endémica y epidémica en la India. Su principal reservorio es el intestino del ser humano. En países desarrollados, el modo de transmisión más frecuente es de persona a persona. Se considera el enteropatógeno bacteriano más transmisible por esta vía (Riveros et al., 2015).

### **MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS Y NO SELECTIVOS**

Para permitir el crecimiento de microorganismos en el laboratorio es necesario aportarles un medio con nutrientes y condiciones fisicoquímicas adecuadas para su desarrollo. El medio de cultivo es aquel que contiene agua y una serie de nutrientes, necesarios para su metabolismo. Normalmente se utilizan placas de Petri con agar más nutrientes específicos (según el microorganismo que se desea aislar), aunque también existen medios de cultivo en tubo. De forma general se puede decir que los medios de cultivo se componen de: una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, amortiguadores de pH, infusiones o extractos obtenidos a partir de tejidos de animales como cerebro, corazón o hígado (Barrero Cuevas, 2016).

Se pueden diferenciar dependiendo de su utilidad como:

- Nutritivos: Permiten el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, por ser muy generales. Como ejemplo de este tipo de medios están el agua de peptona y el caldo de tripticasa de soya.
- De enriquecimiento: Contienen componentes adicionales (además de los básicos) para permitir el desarrollo de microorganismos exigentes, que no crecerían en un medio general.
- Selectivos: Presentan algún componente que impide el desarrollo de microorganismos no deseados. Esto hace que el microorganismo que se desea cultivar lo haga con mayor facilidad. Por ejemplo, el agar MacConkey contiene cristal violeta, que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y hongos, facilitando el desarrollo de bacterias Gram negativas.
- Diferenciales: Contienen sustancias que ponen de manifiesto alguna característica de la especie o grupo de microorganismos. Por ejemplo, el agar MacConkey contiene lactosa y rojo neutro (como indicador); las bacterias fermentadoras de lactosa (lactosa positivas) aparecen de color rosa intenso, mientras que las no fermentadoras de lactosa son incoloras (Barrero Cuevas, 2016).

Las bacterias del cepario crecen en un medio general: MacConkey y medios selectivos los cuales fueron los siguientes: EMB, Hektoen, SS, XLD, Tergitol 7. Agar MacConkey. Es un medio diferencial y selectivo muy utilizado para el aislamiento e identificación de enterobacterias (bacilos Gram negativos). Contienen lactosa y rojo neutro como indicador de pH. Las bacterias fermentadoras de lactosa acidifican el medio y adquieren un color rosado mientras que las no fermentadoras de lactosa aparecen incoloras. Agar eosina-azul de metileno (EMB). Es similar al MacConkey, pero contiene eosina y azul de metileno como indicadores. Se utiliza para el aislamiento y diferenciación de enterobacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. El crecimiento de *E. coli* aparece oscuro y con brillo verde metálico.

Agar Hektoen entérico (HE). Es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento y diferenciación de especies de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Entre otros componentes, tiene sales biliares y colorantes como fucsina ácida y azul de

bromotimol. Estos retrasan el crecimiento de otras bacterias, favoreciendo el desarrollo de especies de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Es también diferencial porque las bacterias lactosa negativas (*Salmonella* y *Shigella*) aparecen de color verdeazulado (color original del medio), mientras que las lactosa positivos por ejemplo (*E. coli*), adquieren un color de amarillo a salmón por el cambio de color del azul de bromotimol. Agar SS (*Salmonella* y *Shigella*). Es muy parecido al agar Hektoen. La finalidad es la misma, pero cambian los colores que adquieren las colonias: lactosa positivas dan un rojo-rosado, Lactosa negativa (*Salmonella* y *Shigella*): incoloras. *Salmonella* aparece con un precipitado negro por la producción de ácido sulfhídrico.

Agar xilosa lisina desoxicolato XLD. Al igual que SS y Hektoen, es selectivo y diferencial de especies de los géneros *Salmonella* y *Shigella*. Agar Tergitol 7, manitol salado (Chapman). Contiene, además de nutrientes, una concentración de sal al 7.5% que impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias, permitiendo el crecimiento selectivo de estafilococos (Barrero Cuevas 2016).

En el laboratorio de microbiología se tiene como tarea la aplicación de una metodología precisa la cual permite la identificación de las enterobacterias de estudio implicadas en los procesos clínicos asociadas a infecciones o aquellos que tienen relación con el hombre. Las técnicas que se aplican son de manera convencional basadas en características fenotípicas, estas se basan en las propiedades observables como lo son su morfología, desarrollo dentro de cultivos, propiedades metabólicas y las pruebas bioquímicas. Las cuales permiten determinar las características metabólicas de las bacterias de estudio, la mayoría son técnicas rápidas ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas horas. Algunas pruebas requieren una incubación previa de 18 a 48 horas, a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras los cultivos en los medios de identificación (Olmos et al., 2010).

## **PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

### **HIERRO KLIGLER**

Este medio de cultivo es utilizado frecuentemente en la diferenciación de las bacterias teniendo como fundamento la fermentación de hidratos de carbono y producción de ácido sulfhídrico. Esta prueba se prepara, se deja gelificar en forma de pico de flauta.

Se siembra a partir de un cultivo puro de la bacteria en estudio, con una aguja se inocula el medio de cultivo picando el fondo del pico de flauta y extendiéndose sobre la superficie de este, y se incuba en una estufa a 37°C durante 18 a 24 horas. Para la interpretación de los resultados se observa el color del medio de cultivo y la producción de gas, tomándose en cuenta los siguientes parámetros:

(K/K =Pico rojo, fondo rojo) (A/A= Pico amarillo, fondo amarillo) (K/A= Pico rojo, fondo amarillo)

1.- SUPERFICIE ALCALINA / PROFUNDIDAD ÁCIDA (PICO ROJO, FONDO AMARILLO): la bacteria solamente fermenta la glucosa. 2.- SUPERFICIE ÁCIDA / PROFUNDIDAD ÁCIDA (PICO AMARILLO, FONDO AMARILLO): a bacteria fermenta glucosa y lactosa. 3.- SUPERFICIE ALCALINA / PROFUNDIDAD ALCALINA (PICO ROJO, FONDO ROJO): a bacteria no es fermentadora de azúcares. 4.- La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que la bacteria produce gas. 5.- El ennegrecimiento del medio indica que la bacteria produce ácido sulfhídrico.

### **UREA**

Este medio es utilizado para diferenciar bacterias con base en su actividad ureásica, aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo de la bacteria la cual puede o no hidrolizar la urea por medio de la enzima ureasa las cuales liberan amoníaco y dióxido de carbono como producto alcalinizando el medio de cultivo generando el cambio de color en el mismo. Se siembra a partir de una colonia pura de la bacteria. en estudio con un asa bacteriológica, se inocula el medio dejando una pequeña muestra en el tubo, dejándose incubar en la estufa a 35-37°C por 18 a 24 horas aunque existan bacterias o microorganismos que hidrolizan la urea lentamente y

pueden requerir hasta 72 horas de incubación. Si el medio de cultivo es de color rosado, la prueba es positiva indica que la bacteria es capaz de hidrolizar la urea.

#### SIM

Medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y sulfuro de hidrógeno de las bacterias en estudio. Es útil para diferenciar miembros de familia Enterobacteriaceae. En este medio de cultivo el triptófano es un aminoácido constituyente de la tripteína y puede ser metabolizado por algunas bacterias para formar indol, el cual se combina con el reactivo de Kovac para originar un compuesto de color rojo, también contiene tiosulfato de sodio con el cual se puede generar ácido sulfhídrico que reacciona con el hierro presente formándose un compuesto de color negro. El agar es el agente solidificante y otorga al medio la propiedad de ser semisólido, condición necesaria para detectar movilidad, que se evidencia por el enturbiamiento del medio o por el crecimiento que difunde más allá de la línea de siembra del M.O. en estudio.

Este medio se siembra por una punción profunda utilizando una aguja de inoculación dejando una muestra de una colonia aislada de la bacteria en estudio en el mismo, dejándose en incubación en una estufa a 35-37°C de 18 a 24 horas. Para la interpretación de los resultados se observa el color del medio de cultivo y la producción de gas, tomándose en cuenta los siguientes parámetros:

#### MOVILIDAD

Resultado positivo: Presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra. Resultado negativo: Crecimiento solamente de la línea de siembra.

#### PRODUCCIÓN DE SH<sub>2</sub>:

Resultado positivo: Ennegrecimiento del medio de cultivo a lo largo de la línea de siembra o en todo medio. Resultado negativo: El medio permanece sin cambio de color.

#### PRUEBA DEL INDOL

Agregar al medio de cultivo 3 a 5 gotas del reactivo de Kovac. Resultado positivo: Color rojo. Resultado negativo: El color del reactivo revelador permanece incoloro-amarillento.

#### CITRATO DE SIMMONS

Medio utilizado para la diferenciación de enterobacterias en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía, para trabajar esta prueba bioquímica se debe dejar gelificar en pico de flauta, tener una punción en el medio y estriar en la superficie del mismo, dejándose en incubación en estufa a 35-37°C de 24 a 72 horas, aunque hay algunas bacterias que pueden requerir hasta 7 días de incubación.

Para la interpretación de los resultados se observa el color del medio de cultivo y la producción de gas, tomándose en cuenta los siguientes parámetros:

POSITIVO: Crecimiento bacteriano con un intenso color azul en el pico de flauta

NEGATIVO: Ausencia de crecimiento y permanencia del color verde en el medio de cultivo.

#### VOGES PROSKAUER- ROJO DE METILO (MR-VP)

Este medio se utiliza para la realización del ensayo de Rojo de Metilo y Voges Proskauer y ayuda para la clasificación de enterobacterias, ya que la glucosa puede ser metabolizada por los M.O. a través de distintas vías metabólicas se pueden generar productos finales diferentes (ácido láctico, acético, fórmico) o productos finales neutros, (acetil metil carbinol), esta prueba se siembra con una inoculación directa a partir del cultivo de estudio en estufa a 35-37°C de 24 a 72 horas. Para la interpretación de los resultados se observa el color del medio de cultivo, tomándose en cuenta los siguientes parámetros:

ROJO DE METILO: Añadir unas gotas de una solución de rojo de metilo, observar el color del medio.

RESULTADO POSITIVO: Color rojo

RESULTADO NEGATIVO: Color amarillo

PRUEBA DE VOGES PROSKAUER: Añadir 0.5 ml de Alfa naftol al 5% en alcohol etílico y 0.2 ml de KOH al 40%, agitar vigorosamente el tubo y dejar a temperatura ambiente durante 10 o 15 minutos, observar el color de la superficie del medio.

RESULTADO POSITIVO: Desarrollo de un color rojo en pocos minutos después de una completa agitación del tubo.

RESULTADO NEGATIVO: Ausencia de color rojo. 10

Una vez teniendo resultados alentadores de las pruebas bioquímicas se procede a observar sus características microscópicas las cuales muestran cómo se agrupan y se estructuran las células, así como su tamaño (Olmos et al., 2010). La tinción de Gram diferencia a las bacterias en dos grandes grupos.

## TINCIÓN DE GRAM

Dentro de la clasificación de procariotas existen dos grandes grupos, las Gram positivas son aquellas que retienen la tinción azul-violeta, y se denomina bacterias Gram negativas a las que se decoloran y después se tiñen con safranina. Esta diferencia de tinciones se debe a la estructura de las paredes celulares de ambos tipos de bacterias. Las bacterias Gram positivas tienen una pared gruesa compuesta de peptidoglucanos y polímeros, e impermeable, que hace que resista la decoloración. En cambio, las bacterias Gram negativas tienen una capa delgada de peptidoglucanos más una bicapa de lipoproteínas que se puede deshacer con la decoloración. Actualmente la tinción de Gram sigue siendo un método eficaz e importante en el laboratorio, además de que es rápido y económico, por lo que se debe estandarizar para evitar errores técnicos o de interpretación (Véase tabla 1).

**Tabla 1.-** Diferencia entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

	Gram positivas	Gram negativas
Color con la tinción de Gram	Violeta	Rojo/Rosado
Pared celular	Gruesa	Delgada
Presencia de lipopolisacáridos en pared celular	Ausente	Presente
Presencia de ácidos lipoteicoicos y teicoicos en pared celular	Presente	Ausente

## **CRIOPRESERVACIÓN**

La criopreservación permite que las bacterias estén disponibles en cualquier momento y pueden ser descongeladas fácilmente para su uso posterior, consiste en un proceso de conservación de las células durante largos periodos de tiempo, a temperaturas bajas (-70°C) sin que pierdan su viabilidad, una de sus ventajas es mantener una línea celular en cultivo continuo por largos periodos de tiempo, utilizando el glicerol como agente crioprotector, permeable a través de la membrana celular, previene la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento y formación de cristales de hielo que rompan la estructura de la membrana, es un método de congelación rápida debido a que su bajo peso molecular permite la entrada rápida a través de la membrana celular modulando estabilidad afectando los procesos de solvatación del agua, descongelación rápida porque se puede realizar a temperatura ambiente (Ávila et al., 2006).

## JUSTIFICACIÓN

La presencia de microorganismos como *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium* pueden generar diferentes y distintas enfermedades en el intestino grueso como el delgado de seres humanos y animales. Al colonizar tejidos extraintestinales, es normal, pero pueden determinar la aparición de infecciones, cuya gravedad depende de la capacidad patológica de la especie en cuestión. El campo de la investigación, el estudio y aislamiento de enterobacterias de importancia clínica se ha convertido en una práctica común y fundamental dentro de hospitales y laboratorios de investigación a través de sus facilidades por un cepario. Los ceparios o colecciones de microorganismos son fuentes de recursos genéticos los cuales contienen unidades funcionales o genes que presentan un valor real o potencial siendo transformados en materia prima fundamental para el desarrollo de investigaciones cuyo propósito es la preservación de la diversidad biológica, garantizando su disponibilidad para actividades de docencia, investigación y comerciales, estas colecciones de microorganismos se desarrollaron a finales del siglo XIX, con el propósito de figurar como repositorios de los recursos biológicos para impulsar el desarrollo de las actividades de investigación (Gutiérrez et al., 2015). Para el observar el crecimiento de estas bacterias de manera controlada se necesita tener un control y registro de las diferentes bacterias las cuales pueden tener un fácil acceso gracias al cepario y poder observar su crecimiento e identificación a través de distintos medios de cultivo los cuales permiten la formación de colonias aisladas y otorgan un fácil acceso a la bacteria para una posterior manipulación, los distintos medios utilizados brindan las condiciones necesarias para el crecimiento de la bacteria evitando así el riesgo de que algún otro microorganismo pueda crecer, contaminando la muestra o las colonias aisladas. En el Laboratorio de Biología Experimental el cepario cumple con la finalidad, preservando diferentes tipos de microorganismos otorgando una gran variedad de especies de estas para futuras investigaciones.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Llevar a cabo el aislamiento, identificación y preservación de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* del cepario del Laboratorio de Biología Experimental n-101 de la UAM-X.

### ESPECÍFICOS

- Llevar a cabo la proliferación de enterobacterias.
- Realizar el aislamiento e identificación de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*
- Realizar la conservación de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*.

## METODOLOGÍA

### PROLIFERACIÓN BACTERIANA

Se descongelaron las cepas correspondientes y fueron vertidas en tubos de 3 mL de medio de BHI estéril (este medio al ser no selectivo permite el crecimiento de varias bacterias y microorganismos) de manera individual, el medio fue incubado por 24 h/37°C hasta observar enturbiamiento en el tubo. Se tomó 1 ml de BHI incubado con anterioridad y se transfirió a un nuevo tubo de BHI estéril incubando nuevamente por 24 h/37°C, hasta observar nuevamente el crecimiento de la bacteria.

### AISLAMIENTO BACTERIANO

Una vez proliferadas la bacteria se aislaron por estriado de manera individual en agar MacConkey, fueron incubadas por 24h/37°C. Las colonias aisladas se sembraron en medios de cultivo selectivos; para *E. Coli* (MacConkey, Tergitol 7, Hektoen y EMB), para *Shigella dysenteriae* (MacConkey, SS), *Shigella flexneri* (MacConkey, Tergitol 7, Hektoen, SS), *Salmonella typhimurium* (MacConkey, XLD,

SS) para observar las características morfológicas y metabólicas de cada colonia bacteriana respectivamente.

#### IDENTIFICACIÓN METABÓLICA

Las colonias aisladas de cada medio de cultivo selectivo se sometieron a pruebas bioquímicas, las cuales incluyeron dos baterías: una usada como control y la otra para incubarse con la colonia aislada, preparadas con Hierro Kligler, Citrato de Simmons, Urea, SIM, Voges Proskauer y rojo de metilo para cada bacteria. Una vez sembradas las baterías de bioquímicas fueron incubadas por 24h/37°C, transcurrido el tiempo los resultados de las bacterias fueron contrastados con la literatura, observando si existía algún cambio de color con la bacteria de control o producción de ácido sulfhídrico, gas, etc.

#### IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA

La realización de la tinción de Gram se tomó parte de una colonia aislada del medio selectivo de cada bacteria y se fijó en un portaobjetos con una gota de agua y calor por parte del mechero, se añadió cristal violeta por un minuto y se enjuago con agua por un minuto, pasado esto se añadieron gotas de yodo, se deja por un minuto y se enjuaga, después se añadieron gotas de alcohol acetona por un minuto y se enjuago de la misma manera, por último se añadió safranina por treinta segundos y se enjuagó con agua, con una sanita se retira el exceso de agua y se llevó el portaobjeto al microscopio y observaron las características microscópicas de la bacteria. Las características se registraron y compararon con la literatura para confirmar la identidad de cada bacteria.

#### CRIOPRESERVACIÓN

Ya identificados las bacterias con las pruebas bioquímicas y la tinción de Gram se tomó una colonia aislada del medio de cultivo selectivo y se conservó en 8 mL de BHI con 2mL de glicerol, se separaron en alícuotas en Eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de volumen final, se etiquetaron y se congelaron a -70°C.

## RESULTADOS

### Descripción macroscópica

En la tabla 2 se detallaron las características de cada colonia en cada medio de cultivo, se observaron distintas particularidades de las diferentes colonias aisladas, las cuales concordaban con la literatura citada, ejemplo: *E. coli* en el agar EMB cumple con las características detalladas una de ellas siendo el color verde metálico particular, el agar MacConkey distinguido por ser un agar rico en nutrientes para el fácil crecimiento de distintas bacterias, también mostro cambios en las colonias aisladas de color morado y de color blanco, la literatura (Barrero Cuevas 2016) indica que en caso de presentar colonias moradas (*E. coli*) la bacteria es fermentadora de lactosas, mientras si son incoloras no son fermentadoras de lactosa.

**Tabla 2.** Características macroscópicas de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Shigella flexneri* (*S. f*), *Shigella dysenteriae* (*S. d*) y *Salmonella typhimurium* (*S. t*)

	MacConkey				Tergitol 7		Hektoen		SS			EMB	XLD
Bacteria	<i>E. coli</i>	<i>S. t</i>	<i>S. f</i>	<i>S. d</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. f</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. f</i>	<i>S. t</i>	<i>S. f</i>	<i>S. d</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. T</i>
Tamaño	G	P	G	G	G	P	G	P	P	P	P	G	G
Forma	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	I
Borde	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	I
Propiedad Óptica	O	O	O	T	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Elevación	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx
Consistencia	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	M
Color de colonias	Moradas	Rosas/ Incoloras	Blancas	Blancas	Amarillas	Blancas	Amarillo	Blancas	Blancas	Moradas	Moradas	Verde	Grises
Color de agar	Morado	Morado	Rojo	Rojo	Amarillo	Azul	Amarillo	Verde	Amarillo	Ámbar	Rojo	Café	Rojo

Las bacterias crecieron de manera distinta para cada medio de cultivo mostrando diferencias entre ellas, descritas en la tabla 2 se colocó cada medio de cultivo y se describió cada característica de la siguiente manera:

- Bacteria: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Shigella flexneri* (*S. f*), *Shigella dysenteriae* (*S. d*) y *Salmonella typhimurium* (*S. t*)
- Tamaño de la colonia: Grande (G), Puntiforme (P)

- Forma: Circular (C), Irregular(I), Filamentosa (F) , Rizoide (R ) , Ondulada (O)
- Borde: Entero (E ), Ondulado (O), Irregular (I), Concéntrico (C), Arrugado (A), Circular Irradiado (Ci) , Filamentoso (F ),Ciliado (Cx)
- Propiedad óptica: Traslucida (T), Opaca (O)
- Elevación: Convexa (Cx), Cóncava (Cv), Plana (P), Crateriforme (Cr)
- Consistencia: Butirosa (B), Mucosa (M)
- Color: Cada colonia marcaba su color

Color del medio: De que color terminaba el medio.

### Evaluación Microscópica

La tinción de Gram es utilizada para observar a nivel microscópico las características de los microorganismos o bacterias, cada una de ellas muestra diferentes formas los cuales ayudan a confirmar su identidad, por ser enterobacterias las cuatro bacterias se clasifican dentro del grupo de las Gram negativas debido a su delgada capa de peptidoglicanos más una bicapa de lipoproteínas que se puede deshacer con la de coloración obteniendo ese color rosado-rojo característico, pero teniendo características diferentes como un flagelo en el caso de *E. coli* y *S. typhimurium* o sin presentarlo como el caso de *S. flexneri* y *S. dysenteriae* como se ve en la tabla 3.

**Tabla 3.** Evaluación microscópica de *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*

	<i>E. coli</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. typhimurium</i>
Tinción de Gram	(-)	(-)	(-)	(-)
Morfología	Bacilos móviles con flagelo, no esporulados	Bacilos inmóviles, no esporulados	Bacilos inmóviles, no esporulados	Bacilos móviles con flagelo, no esporulados

### Evaluación metabólica

No todas las bacterias poseen las mismas propiedades, las pruebas bioquímicas determinan si estas poseen alguna enzima particular la cual mediante la adición de algún sustrato por parte del medio de la prueba pueda ocurrir alguna reacción, la

tabla 4 describe los resultados de cada prueba con cada bacteria, la prueba de rojo de metilo indica que las cuatro bacterias pueden metabolizar glucosa, la prueba de citrato puede indicar que solamente *S. typhimurium* usa citrato como fuente de carbono, también muestra que existe movilidad en las pruebas como se puede ver en *E. coli* y *S. typhimurium* concordando con lo observado en la tabla 3. Se observaron diferentes coloraciones en los picos de flauta de las pruebas de hierro Kligler con *S. flexneri*, *S. dysenteriae* y *S. typhimurium* el pico de flauta presentó un pico rojo y fondo amarillo indicando que solamente fermenta glucosa a diferencia de *E. coli* que al presentar un pico y fondo amarillo fermenta glucosa y lactosa.

**Tabla 4.** Resultados de pruebas bioquímicas de *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*.

	<i>E. coli</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. typhimurium</i>
Rojo de metilo	(+)	(+)	(+)	(+)
Voges Proskauer	(-)	(-)	(-)	(-)
Citrato de Simmons	(-)	(-)	(-)	(+)
Urea	(-)	(-)	(-)	(-)
SIM	S I M	S I M	S I M	S I M
	(-) (+) (+)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(+) (-) (+)
Hierro Kligler	Alcalinidad Gas SH <sub>2</sub>			
	A/A (+) (-)	K/A (-) (-)	K/A (-) (-)	K/A (+) (+)

## DISCUSIÓN

La familia de las enterobacterias incluye múltiples géneros y especies de bacilos gramnegativos, algunos de los cuales son patógenos para el ser humano. Tienen una amplia distribución en el agua, el suelo, las plantas y la flora intestinal de muchos animales y del hombre, forman parte de la microbiota normal, pero pueden comportarse como patógenos oportunistas (Fariñas et al., 2013).

La identificación de enterobacterias se basa en la observación y conservación de datos clínicos, características fenotípicas y morfológicas. Evaluadas mediante medios de cultivo, bioquímicas y tinciones. La evaluación de *E. coli* en agar MacConkey mostró colonias grandes de color morado en un medio de color morado indicando la fermentación de lactosa como lo menciona Barrero en su manual de microbiología en 2016, este fenómeno es debido a las propiedades del agar y a las

propiedades de la bacteria, Merino en su artículo de fisiología bacteriana del mismo año publicó que se requieren condiciones específicas para el crecimiento microbiano como el medio, temperatura, requerimientos de oxígeno y pH. *E. coli* y *Salmonella typhimurium* se pueden clasificar como bacterias neutrófilas (Tabla 2) porque manejan un pH de entre 5.5 y 8.0 debido a que el medio era del mismo color para ambas bacterias, pero el color de las colonias era distinto ya que *Salmonella* fermenta glucosa, mostrando falta de color en sus colonias, esta diferenciación ocurre mediante la combinación de lactosa y el indicador de pH rojo neutro indicado en la ficha técnica del medio MacConkey en el 2014.

Por otro lado, *E. coli* y *Salmonella typhimurium* en el medio SIM presentaron movilidad fuera de la línea de sembrado, Santos en el 2005 en su artículo: La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli* describe este comportamiento en *E. coli* como su mecanismo de adherencia inicial el cual consta de un flagelo y el Pili tipo IV (BFP: bundle-forming pilus) o pelos formadores de penachos que tienen como función la autoagregación bacteriana y la adherencia a la célula mediante la formación de microcolonias, permitiendo que éstas se separen y colonicen, lo que facilita una mayor transmisión, para *Salmonella typhimurium*. Ochoa en el 2005 en su artículo de Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella*, menciona que se pueden encontrar distintas adhesinas las cuales son fimbria, fibrilla, flagelo, lipopolisacáridos (LPS) y cápsula. La presencia de cápsula y flagelo en *Salmonella typhimurium* es de una fimbria tipo 3. Estas adhesinas tienen una estructura que les permite reconocer moléculas presentes en las células del hospedero llamadas receptores, con una estereoquímica específica. Esta unión determina los hospederos y el organotropismo de las bacterias; además, tienen la capacidad de activar a los linfocitos B y neutrófilos, lo que resulta en una variedad de respuestas biológicas incluyendo proliferación celular.

El estudio de las distintas *Shigellas* mostraron resultados diferentes, *Shigella* es un bacilo Gram negativo, pequeño, inmóvil, no capsulado, que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Se clasifica en 4 grupos, A, B, C y D que corresponden a *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*), *Shigella flexneri* (*S. flexneri*), *Shigella boydii* y *Shigella sonnei* (*S. sonnei*), respectivamente. Su principal reservorio es el intestino

del ser humano, el modo de transmisión más frecuente es de persona a persona de forma esporádica se describen brotes asociados al consumo de agua o alimentos contaminados (González et al., 2015).

La evaluación de *S. flexneri* en agar MacConkey desarrollo colonias blancas-transparentes indicando que esta bacteria no fermenta lactosa como *E. coli* lo que genera esa falta de color en sus colonias ya que el vire de color es causado por la fermentación de lactosa y el indicador de pH rojo neutro indicado en la ficha técnica del medio MacConkey en el 2014, *S. flexneri* tiene la capacidad de fermentar la glucosa como se puede ver en el medio Tergitol 7 en el cual solo se desarrollan bacterias lactosa negativas , a diferencia de lo que publicó Ramírez en el 2001 en su artículo, *Shigelosis* (disentería bacilar), el crecimiento de *S. flexneri* no mostró colonias azules en el medio pero si un crecimiento en el agar selectivo esto puede ser debido al tiempo de almacenamiento que tenía el medio dentro del laboratorio, permitiendo el seguimiento del estudio se aplicaron las pruebas bioquímicas mostrando que si la bacteria fermentaba glucosa en el medio de Hierro Kligler mostrando una coloración amarilla en el pico de flauta por fermentación de la glucosa se producen ácidos que se detectan por medio del indicador de rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en el medio acido, como lo indica la ficha técnica del Hierro Kligler, concordando con los resultados de la Tabla 3.

La evaluación de *S. dysenteriae* en agar MacConkey mostró unas colonias blancas-transparentes indicando que esta bacteria no fermenta lactosa como *E. coli* lo que genera esa falta de color en sus colonias ya que el vire de color es causado por la fermentación de lactosa y el indicador de pH rojo neutro indicado en la ficha técnica del medio MacConkey en el 2014, en el medio SS se caracterizan sus colonias por no presentar un color como lo indica Barrero en su manual de microbiología en el 2016, *S. dysenteriae* presentó colonias rojas y el medio presentó un color morado esto debido a una mala técnica de esterilización del asa bacteriológica con la que fue sembrada el medio SS, el seguimiento del estudio se aplicaron las pruebas bioquímicas mostrando que si la bacteria fermentaba glucosa en el medio de Hierro Kligler mostrando una coloración amarilla en el pico de flauta por fermentación de la glucosa se producen ácidos que se detectan por medio del indicador de rojo de

fenol, el cual vira al color amarillo en el medio ácido, como lo indica la ficha técnica del Hierro Kligler, concordando con los resultados de la tabla 3.

*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium* se criopreservaron en tubos de BHI con glicerol, Leal y Ramírez en el 2005 en su artículo “Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso” comentan que un rasgo importante a considerar en el momento de la preservación de un microorganismo es el tamaño, ya que células tan pequeñas ofrecen ventajas biológicas, a menor tamaño hay mayor velocidad y eficiencia en el intercambio de nutrientes, sin afectar los ritmos metabólicos ni de crecimiento dentro del medio, en adición, Ávila y colaboradores en el 2006 en su artículo “Puntos básicos de la criopreservación” mencionan que el glicerol funciona como un crioprotector el cual es permeable a través de la membrana celular, previniendo la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento y formación de cristales de hielo que rompan la estructura de la membrana.

## **CONCLUSIÓN**

Las enterobacterias presentan distintas características fenotípicas y metabólicas caracterizadas por los medios de cultivo selectivos y la evaluación microscópica. La identificación correcta de varios microorganismos ayudará a mejorar el cepario del laboratorio N-101, que podría convertirse en un reservorio genético para futuras investigaciones.

## REFERENCIAS

Guerrero, P. P., Sánchez, F. G., Saborido, D. G., & Lozano, I. G. (2014). Infecciones por enterobacterias. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(55), 3276-3282.

Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475.

Navarro, Z. D. C. G. (2010). Enterobacterias. *Antibioticoterapia. Alianza para el uso prudente de Antibiótico (APUA)*.

Riveros, M., & Ochoa, T. J. (2015). Enteropatógenos de importancia en salud pública. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(1), 157-164.

Violeta Gomez. (2019). *Salmonella typhimurium*: características, morfología, ciclo vital. 2019, Liferder Sitio web: <https://www.liferder.com/salmonella-typhimurium/>

Figuroa IM y A Verdugo (2005) Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47(1-2): 25-42.

González Torralba, A., & Alós Cortés, J. I. (2015). Shigelosis, la importancia de la higiene en la prevención.

Olmos, A. F., de la Fuente, C. G., Nieto, J. A. S., & Ramos, S. V. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 5.9.

Rodríguez, P. A., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2), 166-167.

Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cazárez, L. M., Mendoza-Orozco, M. I., Díaz-Marina, J., Burguete-Gutiérrez, J. C., & Feliciano-Guzmán, J. M. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas

de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 35(2), 95-102

Barrero Cuevas L. (2016). Microbiología Clínica. 2016, de Universidad Europea de Madrid pp: 36-48.

Alcaráz L. E, Santorres S. E., Mattana C. M, Centorbi H. J. Aliendro O. E, Echenique D. R. (2017) Bacteriología y Virología, Facultad de Química, Buiquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis pp: 03- 179.

Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., ... & Gómez, C. (2006). Basic points in cryopreservation. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología, 57(4), 291-300.

Ramírez, S. L. (2001). Shigelosis (disentería bacilar). Salud en tabasco, 7(3), 0

Merino, L. (2016). Fisiología bacteriana. Facultad de Medicina-Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional del Nordeste.

Santos, J. R., Ferrat, G. C., & Eichelmann, M. G. (2005). La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. Rev, Latinoamericana Microbiología, 47, 92-101

Ochoa, I. M. F., & Rodríguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de Salmonella sp. Revista latinoamericana de microbiología, 47(1-2), 25-42

González Torralba, A., & Alós Cortés, J. I. (2015). Shigelosis, la importancia de la higiene en la prevención.

Leal, L. C. S., & Ramírez, L. C. C. (2005). Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. Nova, 3(3)

Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 31(6), 402-409

**Fichas técnicas**

[https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2827f877c82.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2827f877c82.pdf)

[https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5af086c156e97.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5af086c156e97.pdf)

[https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a29773969edc.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a29773969edc.pdf)

[http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a29779bd2be8.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a29779bd2be8.pdf)

[http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a284327af905.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a284327af905.pdf)

<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=25755>

<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA  
SALUD**

**LICENCIATURA QUÍMICA FARMACÉUTICA  
BIOLÓGICA**

**IDENTIFICACIÓN, AISLAMIENTO Y PRESERVACIÓN DE  
ENTEROBACTERIAS DEL CEPARIO DE INVESTIGACIÓN  
DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL DE  
LA UAM-X**

Nombre: Aranzha Quiroz Langarica

Matrícula: 2143024151

Dirección: Bernardino de Sahagún #6 Circuito

Historiadores, Ciudad Satélite, Naucalpan de Juárez

Teléfono: 55-41-11-19-66

Correo: aranzha996@gmail.com

**Asesores**

Dra. Ana Laura Esquivel Campos

M. En C. Miguel Ángel Mosqueda Cabrera

Fecha de inicio 27 de Septiembre del 2019

Fecha de término 27 de Marzo del 2020

Fecha de entrega Octubre 2020

Lugar de realización: UAM-X Laboratorio de Biología

Experimental N-101

## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos (BGN) con importancia clínica; producen una gran variedad de enfermedades en el ser humano. Desde el punto de vista clínico, se pueden clasificar en dos grupos, enterobacterias patógenas primarias (*Salmonella enterica*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.* y algunas cepas de *Escherichia coli*) que producen principalmente cuadros gastrointestinales y enterobacterias oportunistas (Guerrero, et al., 2014). Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* crecen fácilmente en los medios de cultivo, tanto no selectivos (por ejemplo, agar sangre y agar chocolate, útiles en muestras generalmente estériles) como selectivos (empleados para sembrar muestras que suelen estar contaminadas por otros microorganismos como es el caso de los medios para la recuperación de *Salmonella* o *Shigella* en muestras de heces) (Guerrero et al., 2014).

### OBJETIVOS

#### GENERAL

Llevar a cabo el aislamiento, identificación y preservación de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* del cepario del Laboratorio de Biología Experimental n-101 de la UAM-X.

#### ESPECÍFICOS

- Llevar a cabo la proliferación de enterobacterias.
- Realizar el aislamiento e identificación de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*
- Realizar la conservación de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*.

## RESULTADOS

### Descripción macroscópica

En la tabla 2 se detallaron las características de cada colonia en cada medio de cultivo, se observaron distintas particularidades de las diferentes colonias aisladas, las cuales concordaban con la literatura citada, ejemplo: *E. coli* en el agar EMB cumple con las características detalladas una de ellas siendo el color verde metálico particular, el agar MacConkey distinguido por ser un agar rico en nutrientes para el fácil crecimiento de distintas bacterias, también mostro cambios en las colonias aisladas de color morado y de color blanco, la literatura (Barrero Cuevas 2016) indica que en caso de presentar colonias moradas (*E. coli*) la bacteria es fermentadora de lactosas, mientras si son incoloras no son fermentadoras de lactosa.

**Tabla 2.** Características macroscópicas de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Shigella flexneri* (*S. f*), *Shigella dysenteriae* (*S. d*) y *Salmonella typhimurium* (*S. t*)

Bacteria	MacConkey				Tergitol 7		Hektoen		SS			EMB	XLD
	<i>E. coli</i>	<i>S. t</i>	<i>S. f</i>	<i>S. d</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. f</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. f</i>	<i>S. t</i>	<i>S. f</i>	<i>S. d</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. T</i>
Tamaño	G	P	G	G	G	P	G	P	P	P	P	G	G
Forma	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	I
Borde	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	I
Propiedad Óptica	O	O	O	T	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Elevación	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx	Cx
Consistencia	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	M
Color de colonias	Moradas	Rosas/ Incoloras	Blancas	Blancas	Amarillas	Blancas	Amarillo	Blancas	Blancas	Moradas	Moradas	Verde	Grises
Color de agar	Morado	Morado	Rojo	Rojo	Amarillo	Azul	Amarillo	Verde	Amarillo	Ámbar	Rojo	Café	Rojo

### Evaluación Microscópica

La tinción de Gram es utilizada para observar a nivel microscópico las características de los microorganismos o bacterias, cada una de ellas muestra diferentes formas los cuales ayudan a confirmar su identidad, por ser enterobacterias las cuatro bacterias se clasifican dentro del grupo de las Gram negativas debido a su delgada capa de peptidoglicanos más una bicapa de lipoproteínas que se puede deshacer con la de coloración obteniendo ese color

rosado-rojo característico, pero teniendo características diferentes como un flagelo en el caso de *E. coli* y *S. typhimurium* o sin presentarlo como el caso de *S. flexneri* y *S. dysenteriae* como se ve en la tabla 3.

**Tabla 3.** Evaluación microscópica de *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*

	<i>E. coli</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. typhimurium</i>
Tinción de Gram	(-)	(-)	(-)	(-)
Morfología	Bacilos móviles con flagelo, no esporulados	Bacilos inmóviles, no esporulados	Bacilos inmóviles, no esporulados	Bacilos móviles con flagelo, no esporulados

### Evaluación metabólica

No todas las bacterias poseen las mismas propiedades, las pruebas bioquímicas determinan si estas poseen alguna enzima particular la cual mediante la adición de algún sustrato por parte del medio de la prueba pueda ocurrir alguna reacción, la tabla 4 describe los resultados de cada prueba con cada bacteria, la prueba de rojo de metilo indica que las cuatro bacterias pueden metabolizar glucosa, la prueba de citrato puede indicar que solamente *S. typhimurium* usa citrato como fuente de carbono, también muestra que existe movilidad en las pruebas como se puede ver en *E. coli* y *S. typhimurium* concordando con lo observado en la tabla 3

**Tabla 4.** Resultados de pruebas bioquímicas de *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*.

	<i>E. coli</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. typhimurium</i>
Rojo de metilo	(+)	(+)	(+)	(+)
Voges Proskauer	(-)	(-)	(-)	(-)
Citrato de Simmons	(-)	(-)	(-)	(+)
Urea	(-)	(-)	(-)	(-)
SIM	S I M	S I M	S I M	S I M
	(-) (+) (+)	(-) (-) (-)	(-) (-) (-)	(+) (-) (+)
Hierro Kligler	Alcalinidad Gas SH <sub>2</sub>			
	A/A (+) (-)	K/A (-) (-)	K/A (-) (-)	K/A (+) (+)

## DISCUSIÓN

La familia de las enterobacterias incluye múltiples géneros y especies de bacilos gramnegativos, algunos de los cuales son patógenos para el ser humano. Tienen una amplia distribución en el agua, el suelo, las plantas y la flora intestinal de muchos animales y del hombre, forman parte de la microbiota normal, pero pueden comportarse como patógenos oportunistas (Fariñas et al., 2013). *E. coli* en agar MacConkey mostró colonias grandes de color morado en un medio de color morado indicando la fermentación de lactosa como lo menciona Barrero en su manual de microbiología en 2016. *E. coli* y *Salmonella typhimurium* se pueden clasificar como bacterias neutrófilas (Tabla 2) porque manejan un pH de entre 5.5 y 8.0 debido a que el medio era del mismo color para ambas bacterias, pero el color de las colonias era distinto ya que *Salmonella* fermenta glucosa, mostrando falta de color en sus colonias.

La evaluación de *S. flexneri* y *S. dysenteriae* en agar MacConkey desarrollo colonias blancas-transparentes indicando que esta bacteria no fermenta lactosa como *E. coli* lo que genera esa falta de color en sus colonias ya que el vire de color es causado por la fermentación de lactosa, en un medio selectivo como SS *S. dysenteriae* presentó colonias rojas y el medio presentó un color morado esto debido a una mala técnica de esterilización del asa bacteriológica.

*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhimurium* se criopreservaron en tubos de BHI con glicerol, Leal y Ramírez en el 2005 en su artículo “Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso” comenta que un rasgo importante a considerar en el momento de la preservación de un microorganismo es el tamaño, ya que células tan pequeñas ofrecen ventajas biológicas, a menor tamaño hay mayor velocidad y eficiencia en el intercambio de nutrientes, sin afectar los ritmos metabólicos ni de crecimiento dentro del medio,

## CONCLUSIÓN

Las enterobacterias presentan distintas características fenotípicas y metabólicas caracterizadas por los medios de cultivo selectivos y la evaluación microscópica. La

identificación correcta de varios microorganismos ayudará a mejorar el cepario del laboratorio N-101, que podría convertirse en un reservorio genético para futuras investigaciones.

## REFERENCIAS

Guerrero, P. P., Sánchez, F. G., Saborido, D. G., & Lozano, I. G. (2014). Infecciones por enterobacterias. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(55), 3276-3282.

Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 31(6), 402-409

Barrero Cuevas L. (2016). *Microbiología Clínica*. 2016, de Universidad Europea de Madrid pp: 36-48.

Leal, L. C. S., & Ramírez, L. C. C. (2005). Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *Nova*, 3(3)



Dra. Ana Laura Esquivel