



# 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
	11	2	2021		28	4	2021

### Datos del Alumno

Nombre : Juárez Moscú David	
Matricula : 2162029747	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica
Domicilio : Norte 66 #3822 Col. Rio Blanco C.P. 07880 Alcaldia Gustavo A. Madero	
Teléfono : 5588477193	Celular : 5584777854
Correo Electrónico : 2162029747@alumnos.xoc.uam.mx	CURP : JUMD840814HDFRSV07

### Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : Mantenimiento de la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Biología Experimental							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio de Biología Experimental N-101							
Dependencia : Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : Coyoacán	Localidad :						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	16	2	2021		16	8	2021

### PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 3.- Público

Tipo: 2.- Interno

Orientación: 10.- Otros

### FIRMAS

Fresán Orozco María Cristina 3829

Asesor Interno  
Nombre, firma y No. Económico

Juárez Moscú David

Mendoza Pérez Felipe 7183

Asesor Externo  
Nombre, firma y No. Económico

Mendoza Pérez Felipe 7183



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Xochimilco

Ciudad de México, 19 de agosto 2021

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS  
Presente

Por medio de la presente informo a usted que el alumno David Juárez Moscú con número de matrícula 2162029747, quién cursó la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica ha concluido satisfactoriamente su servicio social en el Laboratorio de Biología Experimental con el proyecto "Mantenimiento de la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Biología Experimental", en el periodo comprendido del 16 de febrero de 2021 al 16 de Agosto de 2021, cumpliendo con un total de 480 horas como marca el reglamento de Servicio Social

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

M. en C. MARÍA CRISTINA FRESÁN OROZCO



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**Unidad Xochimilco**

Ciudad de México, 19 de agosto 2021

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS  
Presente

Por medio de la presente informo a usted que el alumno David Juárez Moscú con número de matrícula 2162029747, quién cursó la Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica ha concluido satisfactoriamente su servicio social en el Laboratorio de Biología Experimental con el proyecto "Mantenimiento de la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Biología Experimental", en el periodo comprendido del 16 de febrero de 2021 al 16 de Agosto de 2021, cumpliendo con un total de 480 horas como marca el reglamento de Servicio Social

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

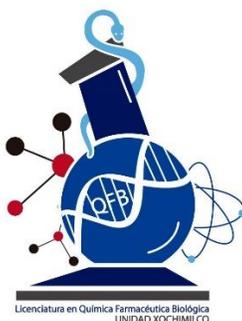
M. en C. FELIPE MENDOZA PÉREZ No Eco. 07183



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**



**MANTENIMIENTO DE LA COLECCIÓN DE CULTIVOS  
MICROBIANOS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA  
EXPERIMENTAL**

**Juarez Moscu David**  
**2162029747**

**Asesor**  
**M en C Maria Cristina Fresan Orozco**  
**M en C Felipe Mendoza Pérez**

**16 agosto 2021**

## Índice

1. Introducción	04
2. Marco teórico	04
2.1. Colección de cultivos microbianos	04
2.2. Importancia de las colecciones de cultivos de referencia	04
2.3. Métodos de conservación de colecciones de cultivos	04
2.3.1. Métodos de conservación a largo plazo	05
2.3.1.1. Conservación por congelación	05
2.3.1.2. Conservación por liofilización	06
2.3.2. Métodos de conservación a corto plazo	07
2.3.2.1. Conservación por transferencia periódica o subcultivo.	07
2.3.2.2. Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril.	08
2.3.3. Métodos alternativos de conservación	08
2.3.3.1. Deseccación sobre sustratos inertes	08
2.3.3.2. Deseccación en papel filtro	08
2.3.3.3. Deseccación sobre bolitas de alginato	09
2.3.3.4. Deseccación en sal gorda para halobacterias	09
2.4. Recobrado de las células.	09
3. Objetivos	09
4. Metodología	09
4.1. Preparación de medios y reactivos	09
4.1.1. Medio enriquecido	09
4.1.1.1. Caldo Infusión cerebro corazón	09
4.1.2. Medios selectivos y diferenciales	09
4.1.2.1. Agar Baird-Parker	09
4.1.2.2. Agar Cetrimida	10
4.1.2.3. Agar Entérico Hektoen (HE)	10
4.1.2.4. Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB)	10
4.1.2.5. Agar Gelosa Sangre	10
4.1.2.6. Agar MacConkey	10
4.1.2.7. Agar Sal y Manitol (MSA)	10
4.1.2.8. Agar Salmonella-Shigella (SS)	10
4.1.2.9. Agar Sulfito de Bismuto (SB)	10
4.1.2.10. Agar Verde Brillante (VB)	10
4.1.2.11. Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD)	11
4.1.3. Pruebas Bioquímicas	11
4.1.3.1. Agar Citrato de Simmons	11
4.1.3.2. Agar DNasa con azul de Toluidina	11
4.1.3.3. Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI)	11
4.1.3.4. Caldo Acetamida	11
4.1.3.5. Caldo Nitrato	11
4.1.3.6. Caldo Urea	11
4.1.3.7. Gelatina nutritiva	11
4.1.3.8. Medio MIO	12
4.1.3.9. Medio OF	12
4.1.3.10. Medio RM-VP	12
4.1.4. Reactivos	12
4.1.4.1. Emulsión de Yema de Huevo	12
4.1.4.2. Plasma fresco	12
4.1.4.3. Reactivo de Griess solución A	12
4.1.4.4. Reactivo de Griess solución B	12
4.1.4.5. Reactivo de Oxidasa de Kovacs	12
4.1.4.6. Reactivo de Kovacs	12
4.1.4.7. Reactivo Voges A	13
4.1.4.8. Reactivo Voges B	13

4.1.4.9.	Rojo de metilo	13
4.1.4.10.	Solución amortiguadora 0,05 M Tris-(hidroximetilaminometano)	13
4.1.4.11.	Solución de azul de toluidina 0,1 M	13
4.1.4.12.	Solución de cloruro de calcio anhidro 0,01 M	13
4.1.4.13.	Solución de Telurito de potasio	13
4.2.	Mantenimiento de la colección de cultivos microbianos	13
4.2.1.	Reactivación	15
4.2.2.	Identificación	15
4.2.2.1.	Bacterias gramnegativas (Enterobacterias)	15
4.2.2.1.1.	Cultivo	15
4.2.2.1.1.1.	<i>Citrobacter</i>	15
4.2.2.1.1.2.	<i>Enterobacter</i>	16
4.2.2.1.1.3.	<i>Escherichia</i>	17
4.2.2.1.1.4.	<i>Klebsiella</i>	17
4.2.2.1.1.5.	<i>Pantoea</i>	18
4.2.2.1.1.6.	<i>Proteus</i>	19
4.2.2.1.1.7.	<i>Salmonella</i>	19
4.2.2.1.1.8.	<i>Serratia</i>	21
4.2.2.1.1.9.	<i>Shigella</i>	21
4.2.2.1.2.	Pruebas bioquímicas	22
4.2.2.1.2.1.	Agar Citrato de Simmons	22
4.2.2.1.2.2.	Agar Hierro Triple Azúcar	22
4.2.2.1.2.3.	Caldo Urea	22
4.2.2.1.2.4.	Medio MIO	23
4.2.2.1.2.5.	Medio RM-VP	23
4.2.2.2.	Bacterias gramnegativas ( <i>Pseudomona aeruginosa</i> )	24
4.2.2.2.1.	Cultivo	24
4.2.2.2.2.	Pruebas Bioquímicas	25
4.2.2.2.2.1.	Desaminación de acetamida	25
4.2.2.2.2.2.	Hidrolisis de gelatina	25
4.2.2.2.2.3.	Prueba de Oxidación/Fermentación de glucosa	26
4.2.2.2.2.4.	Prueba de la oxidasa	26
4.2.2.2.2.5.	Reducción de nitratos	27
4.2.2.3.	Bacterias grampositivas	27
4.2.2.3.1.	Cultivo	27
4.2.2.3.1.1.	<i>Staphylococcus</i>	27
4.2.2.3.2.	Pruebas bioquímicas	28
4.2.2.3.2.1.	Prueba de la coagulasa	28
4.2.2.3.2.2.	Prueba de la Termonucleasa	29
4.3.	Conservación por congelación	29
5.	Conclusiones	29
6.	Objetivos y metas alcanzados	29
7.	Bibliografía	30
	ANEXO A PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA ENTEROBACTERIAS	34
	ANEXO B PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA <i>Pseudomona aeruginosa</i>	37
	ANEXO C PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA <i>Staphylococcus</i>	40
8.	Resumen	41

# 1. INTRODUCCIÓN

El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en la agricultura y la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

Las Colecciones de Cultivos Microbianos son entidades en donde se realizan una serie de actividades cuyo objetivo fundamental es el obtener, preservar, clasificar, estudiar y documentar de manera completa y accesible, un acervo de cultivos de microorganismos auténticamente puros, estables y bien clasificados de interés específico, los cuales generan toda una serie de información especializada de relevancia en diferentes ámbitos como la salud, medicina, industria, agricultura, biotecnología, investigación y docencia (CINVESTAV-IPN, 2016).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. COLECCIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS

Las 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 ciencias (Gutierrez-Jimenez, y otros, 2015). La disponibilidad de microorganismos de referencia para el desarrollo del trabajo constituyó la premisa básica que condicionó el surgimiento del laboratorio cepario, en la actualidad colección de cultivos microbianos (Weng Aleman, Junco Díaz, & Diaz Rosas, 2003).

Los ceparios son el sitio de depósito no solo de cepas de referencia, sino también de microorganismos aislados, caracterizados e identificados a partir de muestras de origen humano, obtenidas de investigaciones realizadas en diferentes periodos de tiempo, habilitando así su categoría como cepas de referencia (Gutierrez-Jimenez, y otros, 2015)

### 2.2. IMPORTANCIA DE LAS COLECCIONES DE CULTIVOS DE REFERENCIA

Los cultivos de referencia se requieren para establecer el desempeño aceptable de los medios (incluidos los kits de ensayos), para validar métodos, verificar la aptitud de los métodos de ensayo y para determinar o evaluar el desempeño en curso. Para demostrar la trazabilidad, los laboratorios deben utilizar cepas de referencia de microorganismos obtenidas directamente de una colección nacional o internacional reconocida, cuando éstas existan (OMS, 2012). Por todo esto una colección de cultivos bien mantenida es un requisito indispensable para las buenas prácticas del laboratorio (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

La Federación Mundial de Colecciones de Cultivo recomienda crear un duplicado de la colección de microorganismos y almacenarla en un lugar diferente, en caso de que dichas colecciones puedan perderse por exposición a riesgos como incendios, inundaciones, terremotos y guerras (Gutierrez-Jimenez, y otros, 2015).

Además, en el Convenio sobre Diversidad Biológica, se ha reconocido que las colecciones microbianas deben preservar la diversidad biológica, facilitar el uso prolongado de sus componentes y distribuir equitativamente los beneficios obtenidos por usar dichos recursos. Así, es deseable que aquellas instituciones que se dediquen a la investigación promuevan el acopio y la preservación de los materiales biológicos (Gutierrez-Jimenez, y otros, 2015).

### 2.3. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE COLECCIONES DE CULTIVOS MICROBIANOS

La preservación de los microorganismos de la colección debe garantizar su viabilidad en estado inactivo, puro y homogéneo, bajo condiciones que aseguren la estabilidad microscópica, macroscópica, bioquímica, fisiológica y

genética, es decir, sin variaciones fenotípicas ni mutaciones con respecto a las condiciones originales (Gutierrez-Jimenez, y otros, 2015).

Para lograr estas condiciones se han establecido varios métodos de preservación con los cuales se trata de mantener el cultivo viable y con un mínimo de cambios genéticos, lo más cercano posible al aislamiento original. La mayoría de los métodos de preservación logran reducir el ritmo metabólico de los organismos por retención de nutrientes, agua y oxígeno; por reducción de la temperatura de conservación; o por combinación de ambos (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

Los criterios para la selección del método son la viabilidad, pureza, costos del proceso, cantidad de cultivo y frecuencia de uso. Según el periodo de tiempo, los métodos pueden ser de corto y largo plazo. Entre los primeros destacan el cultivo continuo, que consiste en realizar subcultivos periódicos a medios frescos. Esta operación de transferencia es imperativa, dado que, al mantenerse las células activas, se van acumulando productos tóxicos del metabolismo, lo que causa envejecimiento y muerte celular. Además, en cada transferencia se incrementa la probabilidad de mutaciones, lo que ocasiona cambios fenotípicos y la pérdida de la calidad axénica de estos cultivos, por el manejo sostenido. Otro inconveniente es el espacio requerido, ya que dependerá de la cantidad de cepas a preservar. También están las técnicas de inmersión en aceite, el congelamiento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la deshidratación (para bacterias formadoras de esporas y mohos) y la conservación en agua destilada. La conservación de microorganismos mediante ultracongelación y liofilización son métodos para preservación a largo plazo, también conocidos como métodos de elección. Con éstos se consigue interrumpir el crecimiento microbiano, pero manteniendo su viabilidad y estabilidad genética. Para conservar grupos de microorganismos no susceptibles de mantenerse con los métodos descritos anteriormente, están los métodos restringidos, basados en la eliminación del agua de las células, entre los que se pueden citar la desecación en papel filtro, en suelo, arena, sílicagel, en esferas de alginato o sal (Gutierrez-Jimenez, y otros, 2015).

### 2.3.1. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO.

Son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto (García López & Uruburu Fernández, 2002). Estos métodos garantizan al máximo la estabilidad genética, al evitar la aparición de generaciones sucesivas y por tanto son los más utilizados en microorganismos que han sido sujetos a manipulaciones genéticas las cuales los hacen diferentes de las cepas de origen y permiten mediante ellas evaluar medicamentos con alto potencial genotóxico y carcinogénico. Por lo tanto, es de vital importancia que el investigador conozca las limitaciones de cada método para que de esta forma pueda obtener resultados reales de gran veracidad investigativa. Entre estos métodos se encuentran la congelación y la liofilización, siendo los más aplicables en cualquier laboratorio (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

#### 2.3.1.1. CONSERVACIÓN POR CONGELACIÓN.

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales, y además existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento (García López & Uruburu Fernández, 2002).

Los factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas por este método son los siguientes:

- Edad de las células: En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado. Esto sucede en el caso de microorganismos que esporulan, en algunos pleomórficos e incluso en algunos más sencillos (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).
- Velocidad en la congelación y descongelación: Aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la

temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

- Temperatura de almacenamiento: Debe ser lo más baja posible. Lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de  $-195^{\circ}\text{C}$ , o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de  $-140^{\circ}\text{C}$ . Si se añade un crioprotector no iónico, como por ejemplo el glicerol, se reduce la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica. Preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión se evita que las cepas se congelen y se descongelen varias veces (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).
- Empleo de agentes crioprotectores: Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%. También se pueden utilizar el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

La mayoría de los microorganismos (bacterias, hongos, virus, bacteriófagos) sobreviven largos períodos en almacenamiento en estado de congelación por la reducción marcada de su ritmo metabólico. Algunos protozoos, algas y células humanas también pueden ser preservados por este método. Existen muchos factores que pueden afectar la viabilidad y estabilidad de los cultivos durante el proceso de congelación, por lo que deben realizarse pruebas de ajustes del grado de enfriamiento y calentamiento, además de la adición de crioprotectores a la suspensión celular (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

El costo inicial del equipamiento puede ser alto pero la seguridad de este método justifica su costo, sobre todo en cultivos difíciles de preservar por otros métodos. Sin embargo, el nivel de nitrógeno líquido de los contenedores debe chequearse diariamente y mantenerse constante la distribución del mismo en todo el recipiente (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

### 2.3.1.2. CONSERVACIÓN POR LIOFILIZACIÓN.

La liofilización consiste en la eliminación del agua de una sustancia congelada por sublimación del hielo bajo vacío. Este proceso consta de tres etapas, la precongelación del producto para asegurar una estructura completamente congelada; el secado primario con el que se elimina la mayor parte del agua por sublimación; y el secado secundario con el que se remueve el agua que queda ligada (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores, de los que hay muchos modelos en el mercado. Es un método muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas, pues una vez conseguidos los líofilos pueden almacenarse a una temperatura ambiente de  $18^{\circ}\text{C}$ - $20^{\circ}\text{C}$  (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

Usualmente el medio de preservación contiene altos niveles de suero, proteínas, aminoácidos (ej: glutamato monosódico), carbohidratos (ej: glucosa, sacarosa) o leche descremada.<sup>26</sup> Entre los crioprotectores recomendados se encuentran el inositol, para la mayoría de las bacterias; la leche descremada para hongos y actinomicetos, pero para algunos microorganismos pueden ser más convenientes otros crioprotectores, como por ejemplo el glutámico-glutamato para las bacterias lácticas, mezclas de glucosa con caldo hígado o chopped meat (sin carne) para bacterias anaerobias, etc. (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

Los factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son:

1. Tipo de microorganismo. Hay algunos microorganismos que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).
2. Concentración celular. Lo mejor es liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de  $10^8$ - $10^9$  células/mL en el caso de las bacterias y algo inferior en el caso de hongos filamentosos y levaduras, debido a que siempre se pierde alrededor de  $10^2$  unidades formadoras de colonia (UFC) durante el proceso (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

3. Temperatura durante la sublimación. Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de  $-50^{\circ}\text{C}$  (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).
4. Grado de deshidratación alcanzado. Debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).
5. Atmósfera de oxígeno en el tubo. Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).
6. Condiciones de almacenamiento. La temperatura debe ser constante, preferentemente a  $18^{\circ}\text{C}$  y sin bajar de los  $0^{\circ}\text{C}$ . Los liofilos se deben guardar en la oscuridad (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

Este método es uno de los más eficaces para la conservación de muchos tipos de microorganismos, como: bacterias, hongos, bacteriófagos y virus; algunos de ellos pueden sobrevivir por períodos de más de 40 años. Es conveniente para la producción y distribución masiva de cultivos, la viabilidad, pureza y estabilidad de los cultivos se mantenga por largos períodos de tiempo, no se requiere de una atención constante después de almacenarse los cultivos liofilizados y cientos de éstos pueden guardarse en un pequeño espacio. Sin embargo, el proceso es complejo y caro, aunque no necesariamente requiere de un equipo sofisticado, se necesita al menos de un sistema de vacío, por lo que no se puede aplicar en laboratorios con recursos limitados (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

### 2.3.2. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO.

Son los que se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección, fundamentalmente por carecer de los equipos necesarios, porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos o porque las cepas contengan construcciones genéticas trayendo consigo que estas pierdan elementos, determinadas características especiales que se utilicen para medir el efecto del medicamento o fármaco en la misma, desde el punto de vista tóxico. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método alternativo, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de estos métodos (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

#### 2.3.2.1. CONSERVACIÓN POR TRANSFERENCIA PERIÓDICA O SUBCULTIVO.

La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido, consiste en la transferencia del cultivo a un medio de cultivo fresco a intervalos que aseguren la viabilidad del mismo. Estos intervalos varían dependiendo de las características del microorganismo en cuestión, algunas especies requieren ser transferidas a nuevos medios después de días o semanas, y otras después de meses o años. Esta frecuencia puede reducirse con el almacenamiento del subcultivo a temperaturas relativamente bajas, en un refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$  o en un freezer entre  $-10^{\circ}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ , bajo aceite mineral o agua (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

Este es el peor método para conseguir la estabilidad genética, puesto que al estar las células creciendo hay una alternancia de generaciones, y al cabo del tiempo las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus características.

Es conocido que el riesgo de contaminación y de cambios genéticos se incrementa a mayor número de transferencias; así como el peligro de pérdida del cultivo sobre todo cuando se trabaja con microorganismos delicados y la posibilidad de que ocurra deshidratación del medio de cultivo, a estos inconvenientes se suma además que cuando hay muchos microorganismos el trabajo es muy intenso y se requiere un espacio grande para el almacenamiento (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

Si se va a utilizar este método es aconsejable retardar el envejecimiento y alargar los periodos entre dos resiembras. Esto se puede conseguir de varias maneras como por ejemplo: disminuyendo la cantidad de inóculo; rebajando la proporción de algunos nutrientes en el medio de cultivo; inoculando en picadura los microorganismos

que son anaerobios facultativos, ya que el crecimiento en presencia de oxígeno es más rápido y origina productos generalmente tóxicos (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

En el caso de colecciones pequeñas, éste puede ser un método económicamente factible en cuanto al equipamiento y al tiempo que se invierte (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

### 2.3.2.2. CONSERVACIÓN POR SUSPENSIÓN EN AGUA DESTILADA O EN AGUA DE MAR ESTÉRIL.

Es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias. Consiste en suspender en agua estéril unas cuantas células del cultivo que se quiere conservar. Se pueden preparar en criotubos de los anteriormente mencionados. En este caso la concentración celular no debe ser superior a  $10^4$ - $10^5$  células/mL en el caso de bacterias. Los resultados obtenidos en laboratorios de microbiología en la conservación de microorganismos por este método muestran altos porcentajes de viabilidad en períodos a veces superiores a 5 años. La estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos es buena, pero no se ha comprobado para caracteres específicos como la virulencia, el poder fermentativo y la preservación de transformantes genéticos (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

### 2.3.3. MÉTODOS ALTERNATIVOS DE CONSERVACIÓN.

En este grupo se engloban métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos muy determinados que no resisten bien la liofilización o la congelación, como por ejemplo los géneros bacterianos *Spirillum*, *Rhodospirillum*, etc. Estos métodos de secado son particularmente útiles para conservar microorganismos productores de esporas y su acción se debe a la reducción drástica del metabolismo de los mismos. Sin embargo, no todos los microorganismos sobreviven a estos métodos de secado, por lo que se hace necesario añadir agentes protectores (leche descremada, glutamato sódico al 10%). Una vez secos es importante mantener el producto sellado (tapón de rosca, ampolla) para evitar el contacto con el aire ya que son higroscópicos (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

La desecación es un método simple para la preservación de microorganismos, el trabajo no es muy intenso, el costo es pequeño y la contaminación de los subcultivos es menos probable que con los subcultivos periódicos. Además, puede utilizarse para el almacenamiento de un gran número de cultivos. A pesar de esto, resulta difícil evaluar detalladamente su confiabilidad, ya que en la mayoría de los casos, la información apropiada no está disponible y en otros está restringida a un número limitado de microorganismos. De cualquier modo, los cultivos no deben ser preservados solamente por este método sin una investigación previa (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

#### 2.3.3.1. DESECACIÓN SOBRE SUSTRATOS INERTES.

El método de almacenamiento de microorganismos en estado de secado ha sido aplicado como un método de preservación particularmente para bacterias y hongos que consiste en la separación del agua y la prevención de la rehidratación. Para el desarrollo de los métodos de desecación se han empleado como sustratos inertes: arena, tierra, zeolita, sílicagel, discos y tiras de papel, tapones de algodón, discos de gelatina y cuentas de vidrio y de porcelana (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

#### 2.3.3.2. DESECACIÓN EN PAPEL DE FILTRO.

Se utiliza un papel bastante absorbente (Whatmann nº 3) que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles). También es posible desecarlos por el procedimiento que se llama desecación líquida (L-Dry) porque se utiliza para ello el liofilizador, pero sin que haya habido congelación previa de las células. El vacío producido por el liofilizador deseca las células, pero hay que evitar que un vacío excesivo provoque evaporación brusca con ebullición (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

### 2.3.3.3. DESECACIÓN EN BOLITAS DE ALGINATO.

Este es un procedimiento bastante eficaz. Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua. Estas bolitas de alginato se pueden conservar en tubos cerrados herméticamente y a temperaturas de entre 4°C y 18°C, pudiéndose guardar incluso a -80°C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

### 2.3.3.4. DESECACIÓN EN SAL GORDA PARA HALOBACTERIAS.

Para su conservación por este método se mezclan las células con sal y se dejan desecar espontáneamente. Debido a la higroscopicidad de la sal, la desecación no es total, pero las células dejan de multiplicarse por ser insuficiente el nivel de agua disponible (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

## 2.4. RECOBRADO DE LAS CÉLULAS.

Cualquiera que haya sido el método empleado en la conservación de las cepas microbianas, cuando éstas se recuperan para hacer nuevos lotes para su conservación o para trabajar con ellas, se recomienda no utilizar directamente las células que se han estado guardando, porque éstas vienen de una situación de estrés más o menos fuerte (sobre todo cuando se han conservado por liofilización) y por lo tanto no son adecuadas para ningún tipo de prueba. Primero habría que revitalizarlas o rejuvenecerlas sembrándolas en un medio no selectivo, es decir, un medio que asegure lo más posible el crecimiento, y a partir de este primer crecimiento ya se puede trabajar con ellas, cultivándolas en medios selectivos cuando sea necesario (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

## 3. OBJETIVOS

- Objetivo general
  - Conservar cepas Gram positivas y Gram negativas.
- Objetivos específicos
  - Reconstituir, activar, cultivar, identificar y criopreservar bacterias Gram positivas
  - Reconstituir, activar, cultivar, identificar y criopreservar bacterias Gram negativas

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS

#### 4.1.1. MEDIO ENRIQUECIDO

##### 4.1.1.1. Caldo infusión cerebro corazón (BHI)

Suspender 37 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Distribuir 3 mL en tubos con tapón de baquelita y esterilizar a 121°C durante 15 minutos (Condalab, 2020).

Para obtener mejores resultados, el medio debe usarse el mismo día, de no ser así, debe calentarse en agua hirviendo para expulsar el oxígeno disuelto y dejar enfriar antes de usar.

#### 4.1.2. MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES

##### 4.1.2.1. Agar Baird-Parker

Suspender 56 gramos del medio en 1 litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C (Condalab, 2020). Añadir asepticamente 5 mL de Emulsión de Yema de Huevo y

1 mL de Telurito de potasio a 95 mL de Base de Agar Baird Parker. Homogenizar suavemente y distribuir 20 mL en placas de Petri estériles (NOM-115-SSA1-1994, 1995).

#### 4.1.2.2. Agar Cetrimida

Suspender 45,3 gramos del medio en un litro de agua destilada. Agregar 10 ml de glicerol. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta la disolver por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C y distribuir 20 mL en placas de Petri estériles (Condalab, 2020).

#### 4.1.2.3. Agar Entérico Hektoen (HE)

Suspender 75,6 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta la disolución completa. EVITAR EL SOBRECALENTAMIENTO. NO AUTOCLAVAR. Enfriar a 47 °C y distribuir 20 mL en placas de Petri estériles (Condalab, 2019).

#### 4.1.2.4. Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB)

Suspender 36 g del polvo en 1 litro de agua purificada. reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición hasta su disolución total. Esterilizar en autoclave 121°C durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45-50°C y distribuir 20 mL en placas de Petri estériles (Condalab, 2019).

#### 4.1.2.5. Agar Gelosa Sangre

Suspender 40 gramos de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C y añadir asépticamente 5-10 % de sangre desfibrinada esterilizada, homogenizar y verter en placas de Petri. Hay que tener cuidado para evitar la formación de burbujas cuando se añade la sangre al medio, girar el frasco o botella suavemente para crear una solución homogénea (Condalab, 2020).

#### 4.1.2.6. Agar McConkey

Suspender 50 gramos del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición 1 a 2 minutos hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45-50 °C y distribuir 20 mL en placas de Petri estériles (Condalab, 2019).

#### 4.1.2.7. Agar Sal y Manitol (MSA)

Suspender 111 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C, mezclar bien y distribuir 20 mL en placas de Petri estériles (Condalab, 2019).

#### 4.1.2.8. Agar Salmonella-Shigella (SS)

Suspender 60 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien hasta obtener una suspensión homogénea. Calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolver por completo. NO AUTOCLAVAR. Enfriar a 45-50 °C y distribuir 20 mL en placas de Petri estériles (Condalab, 2019).

#### 4.1.2.9. Agar Sulfito de Bismuto (SB)

Suspender 52,3 gramos de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta la disolución completa. EVITAR SOBRECALENTAR. NO AUTOCLAVAR. Enfriar a 45°C (muy importante), mezclar bien y distribuir 20 mL en placas de Petri estériles (Condalab, 2020).

#### 4.1.2.10. Agar Verde Brillante (VB)

Suspender 54,7 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada y dejarlo durante 15 minutos. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. EVITAR EL SOBRECALENTAMIENTO. NO AUTOCLAVAR. Enfriar el medio a 45-50°C Distribuir 20 mL en placas de Petri estériles (Condalab, 2020).

#### 4.1.2.11. Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD)

Suspender 54 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta la disolución completa. EVITAR EL SOBRECALENTAMIENTO. NO AUTOCLAVAR. Enfriar a 45-50°C y distribuir 20 mL en placas de Petri estériles (Condalab, 2020).

### 4.1.3. PRUEBAS BIOQUIMICAS

#### 4.1.3.1. Agar Citrato de Simmons

Suspender 24,3 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir 3 mL en tubos con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar enfriar en una posición inclinada para obtener fondos de tubo cortos de 1 a 1,5cm de profundidad (Condalab, 2019).

#### 4.1.3.2. Agar DNasa con Azul de Toluidina

Suspender 42,1 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver por calentamiento con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta su completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C, mezclar bien y distribuir 20 mL en placas de Petri estériles o 3 mL en portaobjetos estériles (Condalab, 2019).

Si no se cuenta con el agar DNasa con azul de Toluidina, este se puede preparar disolviendo 0.03 gramos de DNA helicoidal de timo de ternera, 1 gramo de agar, 0.1 mL de solución cloruro de calcio 0.01M, 1 gramo de cloruro de sodio en 100 mL de Tris-(hidroximetil-aminometano), agitando hasta la completa disolución del DNA y calentar a ebullición. Agregar 0.3 mL de azul de Toluidina 0.1M, y distribuir 20 mL en placas de Petri estériles o 3 mL en portaobjetos estériles (NOM-115-SSA1-1994, 1995).

Cuando el agar solidifique, hacer orificios con la punta de una pipeta Pasteur (NOM-115-SSA1-1994, 1995).

#### 4.1.3.3. Agar Hierro y Triple Azúcar (TSI)

Suspender 64,6 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver completamente. Distribuir 3 mL en tubos con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Deje enfriar en una posición inclinada para obtener fondos de 1,5-2,0 cm de profundidad (Condalab, 2019).

#### 4.1.3.4. Caldo Acetamida

Suspender 17,2 gramos de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Esterilizar por filtración. EVITAR SOBRECALENTAR. NO AUTOCLAVAR. Distribuir 5 mL en tubos con tapón de rosca (Condalab, 2019).

#### 4.1.3.5. Caldo Nitrato

Suspender 21 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver por calentamiento con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta su completa disolución. Distribuir 3 mL en tubos con tapon de rosca y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos (Condalab, 2019).

#### 4.1.3.6. Caldo Urea

Suspender 3,87 gramos del medio en 100 mL de agua destilada sin calentar. Cuando el polvo se disuelva, esterilizar por filtración. Distribuir 2 mL en tubos estériles con tapón de rosca. Se pueden usar volúmenes más grandes pero las reacciones serán más lentas. No esterilizar en autoclave. No hervir el medio (Condalab, 2019).

#### 4.1.3.7. Gelatina Nutritiva

Suspender 128 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver por calentamiento con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo (Condalab, 2019).

Método 1: Distribuir 3 mL en tubos con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Método 2: Esterilizar el medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos, enfriar a 45-50°C y distribuir 20 mL en placas de Petri estériles.

#### 4.1.3.8. Medio MIO

Suspender 31 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Distribuir en tubos de tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos (Condalab, 2019).

#### 4.1.3.9. Medio OF

Suspender 21,38 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver por calentamiento con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta su completa disolución. Dispensar 10 mL del medio en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Dejar los tubos en posición vertical. Justo antes de usar, calentar el medio en agua hirviendo o con vapor de agua durante 15 minutos para eliminar el oxígeno, luego enfriar rápidamente a la temperatura de incubación (Condalab, 2019).

#### 4.1.3.10. Medio RM-VP

Suspender 17 gramos de medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Distribuir 3 mL en tubos con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos (Condalab, 2019).

### 4.1.4. REACTIVOS

#### 4.1.4.1. Emulsión de Yema de Huevo.

Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%) o sumergirlos en solución de cloruro mercúrico (1:1000). Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril (NOM-115-SSA1-1994, 1995).

En campana de flujo laminar o en condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 ml y completar a 90 ml con solución salina isotónica (NOM-115-SSA1-1994, 1995).

Verter la emulsión a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión. Filtrar a través de gasas. Las placas deben utilizarse dentro de las 48 h siguientes a su preparación (NOM-115-SSA1-1994, 1995).

#### 4.1.4.2. Plasma Fresco

Extraer sangre venosa humana o de animal. Se puede usar cualquiera de los siguientes anticoagulantes: EDTA, oxalato de calcio, heparina o citrato de sodio. Mezclar bien y centrifugar. Retirar asépticamente el sobrenadante (plasma), sin hematíes y depositar en un tubo estéril (Lifeder, 2019).

#### 4.1.4.3. Reactivo de Griess Solución A

Mezclar 8 gramos de ácido sulfanílico en 1 litro de ácido acético 5N (Universidad Central de Venezuela, 2017).

#### 4.1.4.4. Reactivo de Griess Solución B

Mezclar 5 gramos de  $\alpha$ -naftilamina en 1 litro de ácido acético 5 N (Universidad Central de Venezuela, 2017).

Nota: La  $\alpha$ -naftilamina, puede sustituirse por  $\alpha$ -naftol, N,N-dimetil-1-naftilamina o ácido de Cleve (Ácido 5 amino 2 naftilensulfónico)

#### 4.1.4.5. Reactivo de Oxidasa de Kovacs

Se prepara disolviendo 1 gramo de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina en 50 ml de agua destilada. Se calienta sutilmente hasta su disolución total. Trasvasar a un frasco color ámbar de capacidad suficiente y completar el volumen a 100 ml con agua destilada. Esperar al menos 15 minutos antes de usar. Guardar en nevera protegido de la luz (Lifeder, 2019).

#### 4.1.4.6. Reactivo de Kovacs

Se miden 150 mL de alcohol amílico, isoamílico o butílico (cualquiera de los tres). En él se disuelven 10 gramos de p-dimetilaminobenzaldehído. Posteriormente se agregan lentamente 50 mL de ácido clorhídrico concentrado.

El reactivo preparado es incoloro o amarillo claro. Debe guardarse en frasco ámbar y conservarse en nevera. Un color castaño oscuro evidencia su deterioro (Lifeder, 2019).

#### 4.1.4.7. Reactivo de Voges A

Pesar 5 gramos de  $\alpha$ -naftol y disolver en 50 mL de alcohol etílico (absoluto). Posteriormente seguir agregando alcohol etílico hasta aforar a 100 mL (Lifeder, 2019).

#### 4.1.4.8. Reactivo de Voges B

Pesar 40 gramos de hidróxido de potasio y disolver en 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitado. El vaso debe colocarse en un baño de agua fría para controlar la temperatura, debido a que al momento de disolver la preparación sube de temperatura bruscamente. Después de que la solución esté fría se trasvasa a un matraz balón aforado y se afora a 100 mL con agua destilada (Lifeder, 2019).

#### 4.1.4.9. Rojo de Metilo

Se pesa 0,1 g de rojo de metilo en 300 ml de alcohol etílico de 95°. Posteriormente, se agregan 200 ml de agua destilada a la preparación anterior. Se recomienda que la solución preparada sea guardada en nevera, y si es posible en alícuotas a -20°C, mejor. En esta forma es estable hasta durante un mes (Lifeder, 2019).

#### 4.1.4.10. Solución Amortiguadora 0,05 M Tris-(Hidroximetilaminometano)

(Tris pH 9) PM = 121,1

Disolver 6,055 g de Tris en 100 ml de agua.

#### 4.1.4.11. Solución de Azul de Toluidina 0,1 M

Disolver 3,05 g de azul de toluidina en 100 ml de agua.

#### 4.1.4.12. Solución de Cloruro de Calcio Anhidro 0,01 M

Cloruro de calcio PM = 110,99

Disolver 0,1199 g de cloruro de calcio en 100 ml de agua.

#### 4.1.4.13 Solución de Telurito de Potasio.

Disolver 1 gramo de telurito de potasio en 100 mL de agua y esterilizar. La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5°C (NOM-115-SSA1-1994, 1995).

## 4.2. MANTENIMIENTO DE LA COLECCIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS

La colección de cultivos microbianos del laboratorio de biología experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco cuenta actualmente con 22 especies bacterianas (tabla 1), agrupadas en los géneros: Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Pantoea, Proteus, Pseudomona, Salmonella, Serratia, Shigella y Staphylococcus. Las bacterias se conservan a -70°C en caldo infusión cerebro corazón (BHI) y glicerol (20%) como agente citoprotector.

MICROORGANISMO	FECHA DE ULTIMA RESIEMBRA	ANALISTA
<i>Citrobacter freundii</i>	13/01/2017	Jesús Rosales
<i>Citrobacter freundii</i>	09/02/2017	Jesús Rosales

<i>Citrobacter freundii</i>	23/01/2019	Alex Nájera
<i>Citrobacter rodentium</i>	13/01/2017	Jesús Rosales
<i>Citrobacter rodentium</i>	23/01/2019	Alex Nájera
<i>Enterobacter aerogenes</i>	08/08/2019	Alex Nájera
<i>Enterobacter aerogenes</i>	09/02/2017	Jesús Rosales
<i>Enterobacter agglomerans</i>	20/01/2017	Jesús Rosales
<i>Enterobacter sp</i>	24/02/2017	Jesús Rosales
<i>Enterobacter sp</i>	08/08/2019	Alex Nájera
<i>Escherichia coli</i>	24/05/2019	Alex Nájera
<i>Escherichia coli</i> O157	09/12/2016	Jesús Rosales
<i>Escherichia coli</i> O42	02/12/2016	Jesús Rosales
<i>Escherichia coli</i> O42	22/08/2019	Alex Nájera
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16/08/2019	Alex Nájera
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17/02/2017	Jesús Rosales
<i>Klebsiella spp</i>	16/08/2019	Alex Nájera
<i>Klebsiella spp</i>	20/01/2017	Jesús Rosales
<i>Pantoea agglomerans</i>	08/08/2019	Alex Nájera
<i>Proteus mirabilis</i>	13/01/2017	Jesús Rosales
<i>Proteus mirabilis</i>	26/09/2018	Alex Nájera
<i>Proteus mirabilis</i> RTX 336	20/01/2017	Jesús Rosales
<i>Proteus mirabilis</i> RTX 336	26/09/2018	Alex Nájera
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	07/02/2017	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12/12/2018	Alex Nájera
<i>Salmonella typhi</i>	12/12/2018	Alex Nájera
<i>Salmonella typhimurium</i>	12/12/2018	Alex Nájera
<i>Serratia marcescens</i>	17/03/2017	Jesús Rosales

<i>Serratia marcescens</i>	12/12/2018	Alex Nájera
<i>Shigella dysenteriae</i>	27/07/2017	Alex Nájera
<i>Shigella dysenteriae</i>	07/11/2018	Alex Nájera
<i>Shigella flexneri</i>	19/10/2019	Alex Nájera
<i>Shigella sonnei (m7 y m9)</i>	07/11/2018	Alex Nájera
<i>Shigella spp</i>	09/02/2017	Jesús Rosales
<i>Shigella spp</i>	19/10/2018	Alex Nájera
<i>Staphylococcus aureus</i>	30/11/2016	Jesús Rosales
<i>Staphylococcus aureus</i>	22/01/2019	Alex Nájera
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13/12/2016	Jesús Rosales

**Tabla 1.** Colección microbiana del laboratorio de biología experimental de la UAM-X

#### 4.2.1. REACTIVACIÓN

La reactivación de las cepas se realiza descongelando 2 viales (tubos eppendorf de 2 mL) a temperatura ambiente (sin utilizar medio externo de transferencia de calor) y transfiriendo el contenido asépticamente a un tubo con 3 mL de caldo infusión cerebro corazón (HIB), un tubo por vial, e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h.

#### 4.2.2. IDENTIFICACIÓN

##### 4.2.2.1. BACTERIAS GRAMNEGATIVAS (enterobacterias)

###### 4.2.2.1.1. CULTIVO

###### 4.2.2.1.1.1. Citrobacter

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar MacConkey e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 2), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de por lo menos 2 de los siguientes medios: agar Entérico Hektoen, agar Salmonella-Shigella, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato, agar Eosina-Azul de Metileno y agar Verde Brillante, e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 2), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar MacConkey	Colonias mucoides de color rosa
Agar Entérico Hektoen	Colonias grandes, color amarillo o salmón
Agar Salmonella-Shigella	Crecimiento leve, colonias color rosa
Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato	Colonias mucoides, amarillas
Agar Eosina-Azul de Metileno	Colonias grandes, mucoides, color negro azulado
Agar Verde Brillante	Colonias entre amarillo y verdoso rodeadas por zonas amarillo-verdosas

**Tabla 2.** Características macroscópicas de las colonias de *Citrobacter* en diferentes medios.

Fuente: Becton Dickinson, recuperadas del sitio <http://www.bd.com>

#### 4.2.2.1.1.2. Enterobacter

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar MacConkey e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 3), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de por lo menos 2 de los siguientes medios: agar Entérico Hektoen, agar Salmonella-Shigella, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato, agar Eosina-Azul de Metileno y agar Verde Brillante, e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 3), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar MacConkey	Colonias mucoides de color rosa
Agar Entérico Hektoen	Colonias grandes, color amarillo o salmón
Agar Salmonella-Shigella	Crecimiento leve, colonias color rosa
Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato	Colonias mucoides, amarillas
Agar Eosina-Azul de Metileno	Colonias grandes, mucoides, color negro azulado
Agar Verde Brillante	Colonias entre amarillo y verdoso rodeadas por zonas amarillo-verdosas

**Tabla 3.** Características macroscópicas de las colonias de *Enterobacter* en diferentes medios.

Fuente: Becton Dickinson, recuperadas del sitio <http://www.bd.com>

#### 4.2.2.1.1.3. Escherichia

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar MacConkey e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 4), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de por lo menos 2 de los siguientes medios: agar Entérico Hektoen, agar Salmonella-Shigella, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato, agar Eosina-Azul de Metileno y agar Verde Brillante, e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 4), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar MacConkey	Colonias de color de rosa a rojo (pueden estar rodeadas de una zona con precipitación de bilis)
Agar entérico Hektoen	Colonias grandes, color amarillo o salmón; pueden inhibirse algunas cepas
Agar Salmonella-Shigella	Crecimiento ligero, colonias color rosa o rojo
Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato	Colonias grandes, planas, de color amarillo. Puede haber algunas cepas inhibidas.
Agar Eosina-Azul de Metileno	Colonias grandes, color negro azulado, brillo verde metálico
Agar Verde Brillante	Colonias entre amarillo y verdoso rodeadas por zonas amarillo-verdosas

**Tabla 4.** Características macroscópicas de las colonias de *Escherichia* en diferentes medios.

Fuente: Becton Dickinson, recuperadas del sitio <http://www.bd.com>

#### 4.2.2.1.1.4. Klebsiella

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar MacConkey e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 5), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de por lo menos 2 de los siguientes medios: agar Entérico Hektoen, agar Salmonella-Shigella, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato, agar Eosina-Azul de Metileno y agar Verde Brillante, e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 5), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar MacConkey	Colonias mucoides de color rosa
Agar Entérico Hektoen	Colonias grandes, colonias color amarillo o salmón
Agar Salmonella-Shigella	Crecimiento leve, colonias color rosa
Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato	Colonias mucoides, amarillas
Agar Eosina-Azul de Metileno	Colonias grandes, mucoides, color negro azulado
Agar Verde Brillante	Colonias entre amarillo y verdoso rodeadas por zonas amarillo-verdosas

**Tabla 5.** Características macroscópicas de las colonias de *Klebsiella* en diferentes medios.

Fuente: Becton Dickinson, recuperadas del sitio <http://www.bd.com>

#### 4.2.2.1.1.5. Pantoea

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar MacConkey e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 6), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de por lo menos 2 de los siguientes medios: agar Entérico Hektoen, agar Salmonella-Shigella, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato, agar Eosina-Azul de Metileno y agar Verde Brillante, e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 6), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar MacConkey	Colonias mucoides de color rosa
Agar Entérico Hektoen	Colonias grandes, color amarillo o salmón
Agar Salmonella-Shigella	Crecimiento leve, colonias color rosa
Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato	Colonias mucoides, amarillas
Agar Eosina-Azul de Metileno	Colonias grandes, mucoides, color negro azulado
Agar Verde Brillante	Colonias entre amarillo y verdoso rodeadas por zonas amarillo-verdosas

**Tabla 6.** Características macroscópicas de las colonias de *Pantoea* en diferentes medios.

Fuente: Becton Dickinson, recuperadas del sitio <http://www.bd.com>

#### 4.2.2.1.1.6. Proteus

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar MacConkey e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 7), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de por lo menos 2 de los siguientes medios: agar Entérico Hektoen, agar Salmonella-Shigella, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato y agar Eosina-Azul de Metileno, e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 7), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar MacConkey	Colonias incoloras, inhibición de agrupamiento dinámico alrededor de colonias aisladas
Agar Entérico Hektoen	Colonias variables, color azul verdoso, azul o salmón, la mayoría de las cepas tienen centro negro o son totalmente de este color
Agar Salmonella-Shigella	Colonias incoloras, con centros blancos
Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato	Colonias de rojo a amarillo. La mayoría de las cepas tienen centros de color negro.
Agar Eosina-Azul de Metileno	Colonias grandes, incoloras

**Tabla 7.** Características macroscópicas de las colonias de *Proteus* en diferentes medios.

Fuente: Becton Dickinson, recuperadas del sitio <http://www.bd.com>

#### 4.2.2.1.1.7 Salmonella

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar MacConkey e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 8), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de por lo menos 2 de los siguientes medios: agar Entérico Hektoen, agar Sulfito de Bismuto, agar Salmonella-Shigella, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato, agar Eosina-Azul de Metileno y agar Verde Brillante, e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 8), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar MacConkey	Colonias incoloras. Color del medio: Anaranjado a ámbar
Agar Entérico Hektoen	Colonias de color azul verdoso o azul; la mayoría de las cepas tienen centro negro o son totalmente de este color
Agar Sulfito de Bismuto	<p>Las colonias de <i>Salmonella Typhi</i> suelen verse en este agar en 24 horas con un centro negro y rodeadas de un halo verde brillante. Mientras que, en 48 horas se tornan negras completamente debido a la formación de sulfuro de hidrógeno.</p> <p><i>Salmonella Paratyphi A</i>: presenta colonias con características variables. Después de 18 horas de incubación pueden observarse colonias negras, verdes o transparentes, con aspecto mucoso. En tanto que, a 48 horas se observan completamente negras y algunas veces con un brillo metálico pronunciado.</p> <p><i>S. Paratyphi A</i> tiende a ennegrecer el medio alrededor de la colonia.</p> <p><i>Salmonella sp</i> muestran colonias negras o gris verdosas, con o sin brillo metálico, pudiendo ennegrecer el medio circundante o no.</p> <p>Las cepas de coliformes, por lo general, son inhibidas totalmente, pero si logran crecer se desarrollan como colonias de color verde o marrón opacas y sin brillo metálico. No tiñen el medio alrededor de la colonia.</p>
Agar Salmonella-Shigella	Incoloro, generalmente con centro de color negro
Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato	<p>Salmonella, positivas a H<sub>2</sub>S: colonias de rojo a amarillo con centros de color negro</p> <p>Salmonella, negativas a H<sub>2</sub>S: colonias rojas</p>
Agar Eosina-Azul de Metileno	Colonias grandes, desde incoloras hasta color ámbar
Agar Verde Brillante	<p><i>Salmonella distinta a S. typhi y S. paratyphi</i>: Colonias entre blancas y rojas, rodeadas de zonas rojas</p> <p><i>S. typhi y S. paratyphi</i>: crecimiento nulo o solo trazas</p>

**Tabla 8.** Características macroscópicas de las colonias de *Salmonella* en diferentes medios.

Fuente: Becton Dickinson, recuperadas del sitio <http://www.bd.com>

#### 4.2.2.1.1.8. Serratia

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar Nutritivo o agar sangre e incubar en aerobiosis preferentemente a 28°C (también se puede incubar a 37°C) durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 9), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar MacConkey, e incubar en aerobiosis preferentemente a 28°C (también se puede incubar a 37°C) durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 9), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar nutritivo	Colonias color blanco crema si son incubados a temperatura de 37°C, mientras que a temperatura ambiente las colonias pueden presentar un pigmento color rojo-naranja.
Agar sangre	
Agar MacConkey	Colonias color rosado pálidas o incoloras a 37°C y a 28°C suben la tonalidad de su color.

**Tabla 9.** Características macroscópicas de las colonias de *Serratia marcescens* en diferentes medios.

Fuente: Becton Dickinson, recuperadas del sitio <http://www.bd.com>

#### 4.2.2.1.1.9. Shigella

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar MacConkey e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 10), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de por lo menos 2 de los siguientes medios: agar Entérico Hektoen, agar Salmonella-Shigella, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato y agar Eosina-Azul de Metileno, e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 10), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar MacConkey	Colonias incoloras. Color del medio: Anaranjado a ámbar
Agar Entérico Hektoen	Colonias elevadas, verdes y húmedas
Agar Salmonella-Shigella	Colonias incoloras
Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato	Colonias rojas
Agar Eosina-Azul de Metileno	Colonias grandes, desde incoloras hasta color ámbar

**Tabla 10.** Características macroscópicas de las colonias de *Shigella* en diferentes medios.

Fuente: Becton Dickinson, recuperadas del sitio <http://www.bd.com>

#### 4.2.2.1.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Para la identificación de las enterobacterias se utilizan los siguientes medios para pruebas bioquímicas: agar Citrato de Simmons, agar Hierro Triple Azúcar, caldo Urea, medio MIO, medio RM-VP, y los resultados se comparan con la tabla 11.

##### 4.2.2.1.2.1. Agar Citrato de Simmons

En esta prueba se observa si el organismo es capaz de usar el citrato como fuente de carbono. Es importante que la prueba del citrato sea la primera en inocularse, para evitar el arrastre de proteínas o carbohidratos de otro medio.

El medio citrato de Simmons debe ser ligeramente inoculado en el pico de flauta usando asa recta o aguja, e incubarse durante 24 horas a 35-37°C. Culminado el tiempo se observan los resultados.

El sembrado se realiza únicamente en la superficie del agar. No hacer punción.

**Interpretación:** Si el medio queda del color original (verde) y no hay crecimiento visible, la prueba es negativa, pero si el medio cambia a color azul, indica la presencia de productos alcalinos, que es detectado por el indicador de pH. En este caso la prueba es positiva (Lifeder, 2019).

##### 4.2.2.1.2.2 Agar Hierro Triple Azúcar

En esta prueba se observa la fermentación de carbohidratos (glucosa, lactosa y sacarosa); producción de gas y producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S)

El sembrado se realizará con un ansa recta o aguja. Se realiza una punción, cuidando que sea por el centro del medio hasta llegar al fondo, y luego se termina el sembrado inoculando la superficie en forma de zigzag. No hacer dos punciones.

Incubar a 37°C en aerobiosis por 18-24 horas. Interpretar en este tiempo, ni antes, ni después.

Interpretación:

- Fermentación de carbohidratos
  - K/K significa bisel alcalino (viraje a rojo) / fondo alcalino (viraje a rojo)
  - K/A significa bisel alcalino (viraje a rojo) y fondo ácido (color amarillo).
  - A/A significa bisel ácido (color amarillo) / fondo ácido (color amarillo).
- Sulfuro de hidrógeno
  - Positivo: presencia de precipitado negro
  - Negativo: ausencia de precipitado negro
- Gas.
  - Positivo: presencia de burbuja, fractura o desprendimiento del medio
  - Negativo: medio intacto.

##### 4.2.2.1.2.3. Caldo Urea

En esta prueba se observa la presencia de ureasa

Para la siembra de la prueba se transfiere una asada del cultivo puro a un tubo con caldo Urea, se emulsiona en el medio líquido y se incuba a 37°C por 24 a 48 horas.

**Interpretación** El medio originalmente es de color amarillo-anaranjado y una reacción positiva hará virar el color del medio a rosado-fucsia. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de amonio producido. Una reacción negativa dejará el medio del color original

#### 4.2.2.1.2.4. Medio MIO

En esta prueba se observa si la bacteria presenta movilidad (M), producción de Indol por la presencia de triptofanasa (I), y la presencia de ornitina descarboxilasa (O).

Para sembrar el medio MIO se utiliza un asa recta o aguja y con ella se recoge una porción de la colonia a estudiar. Se hace una punción profunda en el medio MIO en línea recta. No es recomendable realizar doble punción, ya que puede dar falsa imagen de motilidad si las punciones no se realizan en el mismo sitio. Incubar durante 24 a 48 horas a 37°C en aerobiosis. Observar los resultados en este orden: motilidad, descarboxilación de la ornitina y por último revelar el indol.

Es aconsejable sacar de forma aséptica 2 ml del medio, trasvasarlo a un tubo estéril y realizar allí la prueba del indol, de manera que si da negativa se pueda incubar el resto del tubo original durante 24 horas más, para revelar nuevamente el indol.

El revelado del indol se realiza de la siguiente manera: se agregan 3 a 5 gotas del reactivo de Kovacs en el medio MIO y se agita fuertemente. Se observa si aparece o no un anillo de color rojo fucsia.

#### **Interpretación**

- Motilidad
  - Positiva: se observa un medio turbio o si hay una línea gruesa de crecimiento que se expande alrededor de la inoculación inicial.
  - Negativa: se observa una línea delgada de crecimiento, y todo alrededor estará sin crecimiento.
- Descarboxilación de Ornitina
  - Negativa: medio de color amarillo o con fondo amarillo.
  - Positiva: medio completamente morado.
- Indol
  - Positiva: formación de un anillo de color rojo fucsia al agregar las gotas del reactivo de Kovacs.
  - Negativa: no hay formación de anillo.

#### 4.2.2.1.2.5. Medio RM-VP

En este medio se realiza el test de Voges-Proskauer (VP) que revela la capacidad del microorganismo de formar acetil metil carbinol (acetoína), así como el test de rojo de metilo (RM) que mide la capacidad del microorganismo de producir ácidos por la vía de los ácidos mixtos.

Para realizar ambos test se inocula un caldo RM/VP con el microorganismo en estudio, a partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas. El inóculo no debe ser muy denso. Se incuba a 35-37°C por 24 a 48 horas, aunque en ocasiones es necesaria la incubación por varios días.

#### *Revelado del Test Voges-Proskauer*

Separar una alícuota de 1 mL en un tubo y realizar el revelado de la siguiente manera: coloque 12 gotas (0,6 mL) del reactivo Voges A y 4 gotas (0,2 ml) de Voges B. Mezcle para airear y deje reposar por 5 – 10 minutos antes de interpretar. Sin embargo, si la prueba aún está negativa deje reposar y observe el tubo al cabo de 30 minutos a 1 hora.

**Interpretación.** La aparición de un color rosado-rojo indica que la reacción Voges-Proskauer es positiva. Si el medio se queda amarillo la reacción es negativa.

#### *Revelado del Test de Rojo de Metilo*

Separar una alícuota de 1 mL en un tubo y agregar unas gotas del indicador de pH rojo de metilo. Mezclar y observar el color.

**Interpretación:** Si al agregar las gotas y mezclar el indicador se queda de color rojo, la prueba es positiva. Si por el contrario el color se desvanece y queda del mismo color del medio, la prueba es negativa.

	IND	RM	VP	CS	H <sub>2</sub> S	URE	ORN	MOT	FL	FG	GAS
<i>Citrobacter freundii</i>	-/+	+	-	+/-	+/-	-/+	-	+/-	A o K	A	+/-
<i>Citrobacter rodentium</i>	-	+	-	-	-	+	+	-	A	A	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	A	A	++
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-	+/-	+	A	A	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	A	A	++
<i>Pantoea agglomerans</i>	-/+	-/+	+/-	+/-	-	-/+	-	+	K o A	A	-/+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	+/-	+/-	+	++	+	+	K	A	+
<i>Salmonella tiphy</i>	-	+	-	-	+	-	-	+	K	A	-
<i>Salmonella tiphymorium</i>	-	+	-	+	+	-	+	+	K	A	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	-/+	+	+	-	-/+	+	+	K	A	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	-/+	+	-	-	-	-	-	-	K	A	-
<i>Shigella flexneri</i>	-/+	+	-	-	-	-	-	-	K	A	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	K	A	-
<i>Shigella spp</i>	-/+	+	-	-	-	-	-	-	K	A	-

**Tabla 11.** Comportamiento bioquímico de enterobacterias. IND: indol; RM: rojo de metilo; VP: Voges-Proskauer; CS: Citrato de Simmons; H<sub>2</sub>S: Sulfuro de hidrogeno; URE: Hidrolisis de urea; ORN: Ornitina descarboxilasa; MOT: Motilidad; FG: Fermentadores de glucosa; FL: Fermentadores de lactosa; GAS: Producción de gas; +/-: 50-90% de cepas negativas; +/-: 50-90% de cepas positivas; ++ reacción intensa.

Fuente: Koneman, *Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas a color (6a ed.)*.

#### 4.2.2.2 BACTERIAS GRAMNEGATIVAS (*Pseudomona aeruginosa*)

##### 4.2.2.2.1. CULTIVO

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar sangre e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 12), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar cetrimida e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 12), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar sangre	Las colonias son grandes, pueden ser mucoides o secas. Algunas cepas de <i>P. aeruginosa</i> pueden producir pigmentos con otros colores: piorrubina (rojo), piomelanina (pardo a negro) y pioverdina (amarillo). Presenta un olor característico a uva
Agar cetrimida	Crecimiento con pigmento verde azulado alrededor de las colonias; fluorescencia bajo luz UV (254 nm)

**Tabla 12.** Características macroscópicas de las colonias de *Pseudomonas aeruginosa*.

Fuente: Becton Dickinson, recuperadas del sitio <http://www.bd.com>

#### 4.2.2.2.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Para la identificación de *P. aeruginosa* se realizan las pruebas: desaminación de acetamida, hidrólisis de gelatina, Prueba de O/F, prueba de la oxidasa y reducción de nitratos; los resultados se comparan con la tabla 13

	Desaminación de acetamida	Hidrolisis de gelatina	Prueba O/F	Prueba de la oxidasa	Reducción de nitratos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Positivo	Positivo	Oxidador de glucosa (tubo abierto amarillo y el sellado verde o azul)*	Positivo	Nitratos Positivo Gas Positivo**

**Tabla 13.** Comportamiento bioquímico de *Pseudomonas aeruginosa*.

Fuente: Koneman, *Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas a color (6a ed.)*. \*lifeder.com, \*\*condalab.com

#### 4.2.2.2.2.1. Desaminación de Acetamida

En esta prueba se mide la capacidad del microorganismo para la utilización acetamida como fuente de carbono.

Inocular un tubo de caldo Acetamida con uno o dos asadas de cultivo puro e Incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 2-4 días. Una reacción positiva produce una coloración en el medio de un intenso rojo púrpura (Condalab, 2019).

#### 4.2.2.2.2.2 Hidrolisis de gelatina

Esta prueba se utiliza para investigar la presencia de microorganismos proteolíticos, como lo demuestra la licuefacción de la gelatina. Esta prueba se puede realizar por dos métodos.

##### Método 1

- Inocular los tubos punzando con una aguja (alambre recto) e incubara  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 7 días, o hasta 15 días si es necesario.
- Refrigerar los cultivos junto con un tubo de control de gelatina nutritiva no inoculado y leer las reacciones tan pronto como el tubo de control se haya endurecido invirtiendo el tubo.
- La detección de proteólisis se observa al permanecer líquido el medio de cultivo.

## Método 2

- Inocular las placas de gelatina nutritiva mediante una estría en la superficie e incubar a 37°C durante 2 a 7 días. Comprobar la hidrólisis de la gelatina en la placa agregando una gota de sulfato de amonio saturado o ácido sulfosalicílico al 20% a una colonia aislada. Buscar una zona clara alrededor de la colonia (reacción de Stone) después de 10 minutos.

### 4.2.2.2.3. Prueba de Oxidación/Fermentación de glucosa

Con esta prueba se detecta si el microorganismo utiliza los carbohidratos por vía fermentativa o por la vía oxidativa

Para cada microorganismo se necesitan 2 tubos de medio OF, ambos deben ser inoculados con el microorganismo a estudiar. Se toma la colonia con un asa recta y se hace una punción en el centro del tubo sin llegar al fondo; se pueden hacer varias punciones, siempre y cuando no interese observar motilidad.

A uno de los tubos se le agrega una capa de vaselina líquida estéril o parafina fundida estéril (1 a 2 ml aproximadamente) y se rotula con la letra «F». El otro tubo se deja original y se rotula con la letra «O». Se incuban ambos tubos a 35°C y se observa diariamente hasta por 3 a 4 días.

#### Interpretación

	Oxidativo	Fermentativo	Oxidativo/ Fermentativo	No oxida ni fermenta
<b>Tubo OF abierto</b>	Amarillo	Verde	Amarillo	Verde
<b>Tubo OF cerrado</b>	Verde	Amarillo	Amarillo	Verde

**Tabla 14.** Clasificación de los microorganismos de acuerdo con su comportamiento en los tubos OF abierto (oxidativo) y cerrado (fermentativo). Fuente: <http://microbiologiabiobioanalisis.blogspot.com/2012/07/prueba-oxidacion-fermentacion-of.html>

### 4.2.2.2.4. Prueba de la oxidasa.

Esta prueba evidencia la presencia del complejo enzimático denominado citocromo oxidasa c. Esta prueba se puede realizar por el método de placa directa, métodos indirectos sobre papel o método de discos directo o indirecto.

#### Método de la placa directa

- Se adicionan 2 o 3 gotas de cualquiera de los reactivos antes mencionados para este fin directamente sobre la(s) colonia(s) contenidas en una placa de medio de cultivo que no contenga glucosa. Se interpreta el cambio de color de las colonias, no del medio. El tiempo de reacción válido depende del reactivo utilizado (Lifeder, 2019).

#### Método indirecto sobre papel filtro

- Cortar un trozo de papel de filtro (Whatman N°1) a un tamaño de 6 cm<sup>2</sup> y se coloca dentro de una placa de Petri vacía. Adicionar 2 o 3 gotas del reactivo de oxidasa de Kovacs en el papel, tomar parte de la colonia que se quiere estudiar con un asa de platino o palillo de madera y extenderla en línea recta sobre el papel impregnado de reactivo. Interpretar en un lapso de 5 a 10 segundos (Lifeder, 2019).

#### Discos (método directo)

- Humedecer sutilmente los discos comerciales con agua destilada estéril y sobreponer sobre la colonia a estudiar. Se recomienda usar las placas a 35°C, si se usan placas a temperatura ambiente o placas refrigeradas la reacción es un poco más lenta. Interpretar el cambio de color entre 10 a 20 segundos (Lifeder, 2019).

Discos (método indirecto)

- Humedecer el disco como se describió anteriormente. Colocarlo en una placa de Petri vacía. Tomar cantidad suficiente de la colonia a estudiar con un asa de platino o palillo de madera y colocar sobre el disco. Interpretar el cambio de color entre 10 a 20 segundos (Lifeder, 2019).

#### 4.2.2.2.5. Reducción de nitratos

Con esta prueba se identifica el uso de nitratos por el microorganismo.

Para la siembra de la prueba se transfiere una asada del cultivo puro a un tubo con caldo Nitrito, se añade un tubo de Durham para observar la producción de gas y se incuba a 35°C por 12 a 24 horas (Condalab, 2019).

Para determinar si el nitrato ha sido reducido a nitrito, después de la incubación, se añade al medio de cultivo, 2 gotas de solución A, y luego 2 gotas de la solución B del reactivo de Griess y se mezcla. La aparición de una coloración rosada o roja indica que los nitratos han sido reducidos a nitritos (Universidad Central de Venezuela, 2017).

### 4.2.2.3. BACTERIAS GRAMPOSITIVAS

#### 4.2.2.3.1. *CULTIVO*

##### 4.2.2.3.1.1. *Staphylococcus*

###### Método 1

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar sangre e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 11), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar sal manitol e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 15), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

###### Método 2

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra de placas de agar Baird-Parker depositando 0.1-0.5 mL de cultivo en BHI y distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, se mantienen las placas en la posición hasta que se absorba el inóculo y se incuban en aerobiosis a 35°C durante 45-48 h (NOM-115-SSA1-1994, 1995). Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características (tabla 15), se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio

MEDIO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
Agar Sangre	Colonias grandes, de color entre blanco y gris o entre crema y amarillo, con o sin hemólisis
Agar Sal-Manitol	<i>S. aureus</i> : Colonias amarillas de tamaño mediano, con viraje del medio a amarillo. <i>S. epidermidis</i> : Colonias blancas de tamaño pequeño a mediano, sin viraje del medio (rojo).
Agar Baird-Parker	<i>S. aureus</i> : Crecimiento de bueno a excelente; colonias brillantes, de tamaño mediano y color de gris oscuro a negro; halos transparentes alrededor de las colonias <i>S. epidermidis</i> : Ausencia de crecimiento a crecimiento promedio; colonias pequeñas, de incoloras a color gris amarillado; sin zonas transparentes

**Tabla 15.** Características macroscópicas de las colonias de *Staphylococcus* en diferentes medios  
Fuente: Becton Dickinson, recuperadas del sitio <http://www.bd.com>

#### 4.2.2.3.2. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Para la identificación de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* se realizan las pruebas de la coagula, term nucleasa y fermentación de manitol, y los resultados se comparan con la tabla 16.

	Prueba de la coagulasa	Prueba de la term nucleasa	Fermentación de manitol
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo	Negativo	Negativo

**Tabla 16.** Comportamiento bioquímico de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.  
Fuente: Koneman, *Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas a color* (6a ed.).

##### 4.2.2.3.2.1. Prueba de la Coagulasa.

Esta prueba se utiliza para poner en evidencia la presencia de la enzima coagulasa. Permite diferenciar *S. aureus* del resto de los estafilococos, esta prueba se puede realizar en porta objetos y en tubo (Lifeder, 2019).

Prueba de la coagulasa en portaobjetos (Lifeder, 2019).

- En un portaobjeto se coloca una gota de solución salina y una gota de plasma fresco de forma separada.
- Con un asa se toman 1 o 2 colonias puras del microorganismo a probar.
- Se mezcla la carga bacteriana en la gota de plasma y repita la operación en la gota de Solución Salina Fisiológica (SSF). Observe los resultados de forma inmediata. Un resultado positivo será aquel en donde se observe la formación de un aglutinado macroscópico (precipitado blanco) al cabo de un minuto del lado de la gota con plasma.
- La gota de SSF sirve de control negativo. Si se observa aglutinación con la SSF, esto quiere decir que el microorganismo se auto-aglutina, pudiendo proporcionar resultados falsos positivos. En este caso se debe corroborar con la prueba en tubo.

Prueba de la coagulasa en tubo (Lifeder, 2019).

- Con una pipeta estéril se miden 0,5 mL de plasma fresco y se coloca en un tubo de ensayo estéril de 12 x 75. Con el asa se toman 2 a 4 colonias puras a estudiar provenientes de un cultivo sólido de 18 a 24 horas y se disuelven en el plasma cuidadosamente, mezclar e incubar a 37°C por 4 horas.
- Examinar el tubo a la primera hora sin agitarlo, solo incline suavemente. Si aún no se observa coágulo, se puede seguir observando cada 30 minutos hasta completar las 4 horas. Si después de 4 horas aún sigue negativo se puede dejar hasta por 24 horas, pero a temperatura ambiente. Observar y reportar el resultado.

Con base en la experiencia, algunos microbiólogos recomiendan usar 500 µl de una suspensión bacteriana proveniente de un cultivo de 18 horas en medio líquido para realizar la prueba. Al parecer ofrece resultados más rápidos y confiables que cuando se emulsionan colonias provenientes de medios sólidos, especialmente si se ha usado plasma humano obtenido del banco de sangre. El uso de cepas provenientes de un caldo ayuda a diluir la posible presencia de anticuerpos anti-estafilocócicos humanos en el plasma que puedan inhibir la acción de la coagulasa (Lifeder, 2019).

#### 4.2.2.3.2.2. Prueba de la Termonucleasa.

Calentar durante 15 min, 0,3 ml de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo. Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio. Incubar a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24 h. La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se califica como positiva (NOM-115-SSA1-1994, 1995).

### 4.3. CONSERVACIÓN POR CONGELACIÓN

Con la bacterias bien identificada por pruebas bioquímicas, se toma una colonia y se siembra por agitación en un tubo con 8 mL de caldo infusión cerebro corazón, y se incuba en aerobiosis a 37°C por 18-24 horas, posteriormente se agregan 2 mL de glicerol al 20%, y se homogeniza con agitación en vórtex, y se distribuyen 2 mL en tubos eppendorf, se identifican colocando el nombre del microorganismo, fecha de conservación y nombre del analista. Por último, los tubos se colocan en un frasco y se identifica de la misma forma que los tubos, y se colocan en congelación a -70°C.

## 5. CONCLUSIÓN

El mantenimiento de la colección de cultivos microbianos es una de las tareas de gran importancia en un laboratorio en el que se lleva a cabo investigación, sobre todo cuando se trata de cultivos de referencia, ya que un manejo inadecuado puede dar lugar a mutaciones importantes en la cepa, como cambios en el metabolismo bacteriano y resistencia antimicrobiana; estas mutaciones interfieren en los resultados de los ensayos, dando falsos positivos o negativos, lo que se traduce en la disminución de la fiabilidad de los resultados del laboratorio y la consecuente pérdida en la investigación.

Por esta razón se opta por métodos de conservación a largo plazo, como la ultracongelación y liofilización, ya que en ellos se interrumpe la actividad metabólica, crecimiento y proliferación, pero conservando la viabilidad y estabilidad genética de las células, evitando mutaciones importantes y asegurando que el cultivo se encuentre lo más próximo al aislamiento original.

## 6. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

Debido a la emergencia sanitaria en la que nos encontramos por efecto de la pandemia los objetivos y las metas propuestas en el documento no se alcanzaron debido a que la parte experimental se tuvo que suspender, por lo que se optó por realizar una revisión bibliográfica del proceso que se debe seguir para el mantenimiento de una colección de cultivos microbianos. En ella se tomaron en consideración los recursos con los que cuenta el laboratorio de biología experimental. Por lo que este documento puede tomarse como base para que cuando la emergencia sanitaria se levante, pueda llevarse de a cabo la parte experimental.

## BIBLIOGRAFÍA

- 100cia. (2016). Agar MIO. Recuperado el 25 de julio de 2020, de [https://twitter.com/100cia\\_/status/1071840757089267712](https://twitter.com/100cia_/status/1071840757089267712)
- Arencibia Arrebola, D. F., Rosario Fernández, L. A., & Gamez Méndez, R. (2008). *Métodos generales de conservación de microorganismos*. Finlay Ediciones.
- Becton Dickinson. (2006). *BD Baird-Parker Agar*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de bd.com: <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-255084.pdf>
- Becton Dickinson. (2013). *BD Brilliant Green Agar*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de bd.com: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8755>
- Becton Dickinson. (2013). *BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de bd.com: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8760>
- Becton Dickinson. (2013). *BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de bd.com: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8765>
- Becton Dickinson. (2013). *BD Hektoen Enteric Agar (HE Agar)*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de bd.com: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8762>
- Becton Dickinson. (2013). *BD Mannitol Salt Agar*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de bd.com: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>
- Becton Dickinson. (2013). *BD Pseudosei Agar (Cetrimide Agar)*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de bd.com: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8794>
- Becton Dickinson. (2013). *BD Salmonella Shigella Agar*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de bd.com: <https://www.bd.com/resource.aspx?idx=8779>
- Becton Dickinson. (2013). *BD XLD Agar (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar)*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de bd.com: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8783>
- Becton Dickinson. (2014). *BD MacConkey II Agar*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de bd.com: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8770>
- Centro Nacional de Referencia de Bacteriología. (2013). *Recomendaciones generales para la vigilancia de laboratorio del cólera en las diarreas*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de <http://www.inciensa.sa.cr>Inciensa: [https://www.inciensa.sa.cr/ensenanza/ensenanza\\_documentos/taller\\_colera/manuales%20y%20procedimientos%20de%20laboratorio/Recomendaciones%20generales%20para%20la%20vigilancia%20de%20laboratorio%20del%20colera.pdf](https://www.inciensa.sa.cr/ensenanza/ensenanza_documentos/taller_colera/manuales%20y%20procedimientos%20de%20laboratorio/Recomendaciones%20generales%20para%20la%20vigilancia%20de%20laboratorio%20del%20colera.pdf)
- Ciencias de la salud. (2019). *PRUEBA DE HIDROLISIS DE GELATINA*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de [cienciasdelasaludnic.blogspot.com](http://cienciasdelasaludnic.blogspot.com): <http://cienciasdelasaludnic.blogspot.com/2019/01/prueba-de-hidrolisis-de-gelatina.html>
- CINVESTAV-IPN. (2016). *Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos celulares*. Recuperado el 3 de Febrero de 2020, de <http://cdbb.cinvestav.mx/cdbb/index.html>
- Condalab. (2019). *Agar Citrato de Simmons*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de [condalab.com: https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1557-5994-agar-citrato-de-simmons-iso.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1557-5994-agar-citrato-de-simmons-iso.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Agar DNasa con Azul de Toluidina (Actividad Desoxirribonucleasa)*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de [condalab.com: https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1285-5707-agar-dnasa-con-azul-de-toluidina-actividad-desoxirribonucleasa.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1285-5707-agar-dnasa-con-azul-de-toluidina-actividad-desoxirribonucleasa.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Agar Entérico Hektoen ISO*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de [condalab.com: https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/18-4565-agar-enterico-hektoen-iso.html](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/18-4565-agar-enterico-hektoen-iso.html)

- Condalab. (2019). *Agar Eosina y Azul de Metileno (EMB)*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/35-4732-agar-eosina-y-azul-de-metileno-emb.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/35-4732-agar-eosina-y-azul-de-metileno-emb.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Agar Hierro y Triple de Azucar (TSI)*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/50-4887-agar-hierro-y-triple-de-azucar-tsi.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/50-4887-agar-hierro-y-triple-de-azucar-tsi.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Agar Mac Conkey N°2*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/26-7224-agar-macconkey-n-2.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/26-7224-agar-macconkey-n-2.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Agar Sal y Manitol (MSA) (Medio Chapman) EP/USP/ISO*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/81-8719-agar-sal-y-manitol-msa-medio-chapman-ep-usp-iso.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/81-8719-agar-sal-y-manitol-msa-medio-chapman-ep-usp-iso.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Agar Salmonella Shigella (AgarSS)*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/82-5159-agar-salmonella-shigella-agar-ss.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/82-5159-agar-salmonella-shigella-agar-ss.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Caldo Acetamida*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/979-5400-caldo-acetamida.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/979-5400-caldo-acetamida.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Caldo Nitrato*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1062-5483-caldo-nitrato.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1062-5483-caldo-nitrato.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Caldo Urea*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/997-5418-caldo-urea.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/997-5418-caldo-urea.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Gelatina Nutritiva*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1073-5494-gelatina-nutritiva.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1073-5494-gelatina-nutritiva.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Medio Glucosa OF ISO*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1345-5767-medio-glucosa-of-iso.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1345-5767-medio-glucosa-of-iso.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Medio MIO (Movilidad-Indol-Ornitina)*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1200-5621-medio-mio-movilidad-indol-ornitina.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1200-5621-medio-mio-movilidad-indol-ornitina.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2019). *Medio RM-VP*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1202-5623-medio-mr-vp.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1202-5623-medio-mr-vp.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2020). *Agar Bismuto Sulfito (Wilson Blair) USP*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1512-8984-agar-bismuto-sulfito-wilson-blair-usp.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1512-8984-agar-bismuto-sulfito-wilson-blair-usp.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2020). *Agar Verde Brillante Modificado ISO*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/225-9356-agar-verde-brillante-modificado-iso.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/225-9356-agar-verde-brillante-modificado-iso.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2020). *Agar XLD (Agar Xilosa Lisina Desoxicolato) ISO*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1056-9309-agar-xld-agar-xilosa-lisina-desoxicolato-iso.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1056-9309-agar-xld-agar-xilosa-lisina-desoxicolato-iso.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2020). *Base de Agar Baird Parker ISO*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1091-9367-base-de-agar-baird-parker-iso.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1091-9367-base-de-agar-baird-parker-iso.html#/2-formato-500_g)

- Condalab. (2020). *Base de Agar Ceftrimida EP/USP/ISO*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/150-8941-base-de-agar-ceftrimida-ep-usp-iso.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/150-8941-base-de-agar-ceftrimida-ep-usp-iso.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2020). *Base de Agar Sangre*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/156-9418-base-de-agar-sangre.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/156-9418-base-de-agar-sangre.html#/2-formato-500_g)
- Condalab. (2020). *Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de condalab.com: [https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1139-9431-caldo-infusion-cerebro-corazon-bhi.html#/2-formato-500\\_g](https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1139-9431-caldo-infusion-cerebro-corazon-bhi.html#/2-formato-500_g)
- El Aila, N. (2014). *Enterobacteriaceae II biochemical reaction*. Recuperado el 26 de julio de 2020, de slideshare.net: <https://www.slideshare.net/anwarsh148/enterobacteriaceae-ii-biochemical-reaction-2>
- Facultad de Química UNAM. (2014). *Pruebas Bioquímicas*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de depa.fquim.unam.mx: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/10\\_PruebasBioquimicas\\_27069.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/10_PruebasBioquimicas_27069.pdf)
- Facultad de Química UNAM. (2014). *Pruebas Bioquímicas*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de depa.fquim.unam.mx: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c\\_PruebasBioquimicas\\_17461.PDF](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c_PruebasBioquimicas_17461.PDF)
- García López, M. D., & Uruburu Fernández, F. (2002). La conservación de cepas microbianas. *Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Temas de actualidad*, 30, 12-16. Valencia, Valencia, España: Universitat de València.
- Gutierrez-Jimenez, J., Luna-Cazás, 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.
- Lifeder. (2019). *Agar citrato de Simmons: fundamento, preparación y uso*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de lifeder.com: <https://www.lifeder.com/agar-citrato-de-simmons/#Inoculo>
- Lifeder. (2019). *Agar sulfito de bismuto: fundamento, preparación y usos*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de lifeder.com: <https://www.lifeder.com/agar-sulfito-de-bismuto/>
- Lifeder. (2019). *Agar TSI: fundamento, preparación y usos*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de lifeder.com: <https://www.lifeder.com/agar-tsi/>
- Lifeder. (2019). *Caldo Urea: fundamento, preparación y usos*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de lifeder.com: <https://www.lifeder.com/caldo-urea/>
- Lifeder. (2019). *Medio MIO: fundamento, preparación y usos*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de lifeder.com: <https://www.lifeder.com/medio-mio/>
- Lifeder. (2019). *Prueba de la coagulasa: fundamento, procedimiento y usos*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de lifeder.com: <https://www.lifeder.com/prueba-de-la-coagulasa/>
- Lifeder. (2019). *Prueba de oxidasa: fundamento, procedimiento y usos*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de lifeder.com: <https://www.lifeder.com/prueba-de-oxidasa/>
- Lifeder. (2019). *Rojo de metilo: características, preparación y aplicaciones*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de lifeder.com: [https://www.lifeder.com/rojo-de-metilo/#En\\_la\\_prueba\\_rojo\\_de\\_metilo](https://www.lifeder.com/rojo-de-metilo/#En_la_prueba_rojo_de_metilo)
- Lifeder. (2019). *Serratia marcescens: características, patología y síntomas*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de lifeder.com: [https://www.lifeder.com/serratia-marcescens/#Caracteristicas\\_generales\\_y\\_condiciones\\_de\\_crecimiento](https://www.lifeder.com/serratia-marcescens/#Caracteristicas_generales_y_condiciones_de_crecimiento)
- Lifeder. (2019). *Test Voges-Proskauer: fundamento, preparación y usos*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de lifeder.com: <https://www.lifeder.com/test-voges-proskauer/>
- Microbiología para bioanálisis. (2012). *Prueba Oxidación-Fermentación (OF)*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de [microbiologiabioanalisis.blogspot.com: http://microbiologiabioanalisis.blogspot.com/2012/07/prueba-oxidacion-fermentacion-of.html](http://microbiologiabioanalisis.blogspot.com/2012/07/prueba-oxidacion-fermentacion-of.html)

- Microbitos, G. (2011). *Pruebas bioquímicas primarias: Tinción de GRAM, prueba de catalasa, prueba de oxidasa, prueba de O/F y motilidad*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de microbitosblog.com: <http://microbitosblog.com/2011/09/27/pruebas-bioquimicas-primarias/>
- Microkit. (2014). *ACETAMIDE BROTH (CALDO ACETAMIDA)*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de medioscultivo.com: <https://www.medioscultivo.com/acetamide-broth-caldo-acetamida/>
- NOM-115-SSA1-1994. (1995). *BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN ALIMENTOS*. Ciudad de Mexico: Diario Oficial de la Federación.
- OMS. (Enero de 2012). Buenas Prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica. *Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación farmacéutica*. Washington, DC.
- Printerest. (s.f.). *prueba de oxidasa positiva*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de pinterest.com: <https://www.pinterest.com.mx/pin/472455817131238226/>
- pruebas bioquímicas y medios de cultivo bacteriología*. (2017). Recuperado el 25 de julio de 2020, de vdocuments.mx: <https://vdocuments.mx/pruebas-bioquimicas-y-medios-de-cultivo-bacteriologia.html>
- sariitaa211. (s.f.). *MR-VP | medioscultivolcb1*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de sariitaa211.wixsite.com: <https://sariitaa211.wixsite.com/medioscultivolcb1/mr-vp>
- Terzolo, H. R. (s.f.). *Parte 3 Aislamiento. Producción animal, Bacteriología*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de docplayer.es: <https://docplayer.es/53633144-Parte-3-aislamiento-dr-horacio-raul-terzolo-produccion-animal-bacteriologia.html>
- Torrice V., N. (2005). *Pruebas cocos G+*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de identificacionbacterias.web16.top: <http://identificacionbacterias.web16.top/index.php/cocos-gn/genero-brucella/53-pruebas/pruebas-staphylococcus/42-prueba-de-coagulasa>
- Universidad Central de Venezuela. (2017). *Hidrolisis de la gelatina*. Obtenido de ucv.ve: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/gelatina.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/gelatina.pdf)
- Universidad Central de Venezuela. (2017). *PRODUCCIÓN DE NUCLEASA TERMOESTABLE (TERMONUCLEASA)*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de ucv.ve: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/termoestable.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/termoestable.pdf)
- Universidad Central de Venezuela. (2017). *REDUCCIÓN DE NITRATOS Y DENITRIFICACIÓN*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de ucv.ve: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/nitratos.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/nitratos.pdf)
- Weng Aleman, Z., Junco Díaz, R., & Díaz Rosas, O. (2003). Colección de cultivos microbianos: Apuntes sobre su desarrollo. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 4(1).
- Winn, W., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2008). *Koneman, Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas a color* (6a ed.). Ciudad de México: Editorial Médica Panamericana.

## ANEXO A PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA ENTEROBACTERIAS

### AGAR CITRATO DE SIMMONS

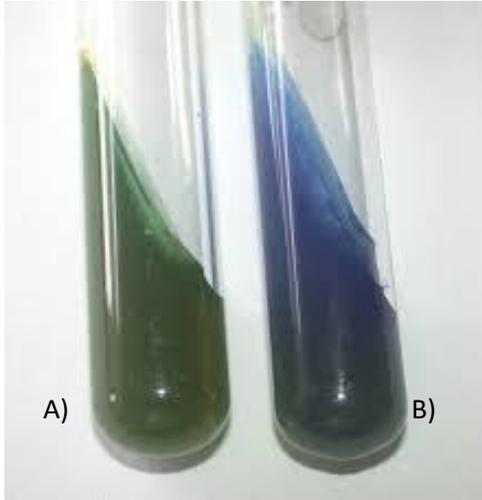


Figura 1A. Agar citrato de Simmons. A) prueba negativa, B) prueba positiva.

Fuente: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/10\\_PruebasBioquimicas\\_27069.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/10_PruebasBioquimicas_27069.pdf)

### AGAR HIERRO TRIPLE AZÚCAR

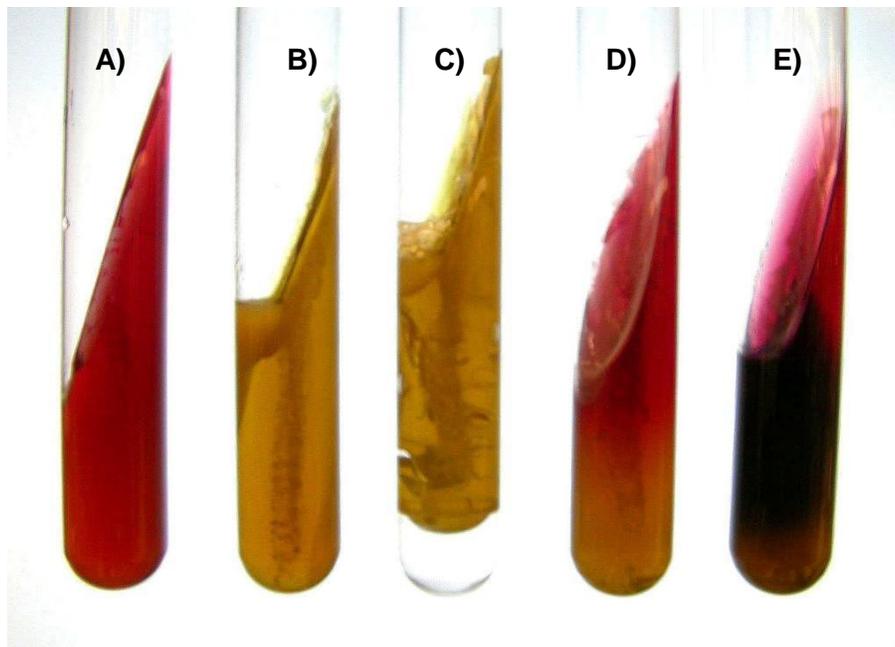


Figura 2A. Agar hierro triple azúcar. A) no fermentador de carbohidratos (K/K), B) fermentador de carbohidratos (A/A), C) producción de gas, D) solo fermenta glucosa (K/A), E) producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S).

Fuente:

<https://docplayer.es/53633144-Parte-3-aislamiento-dr-horacio-raul-terzolo-produccion-animal-bacteriologia.html>

## CALDO UREA

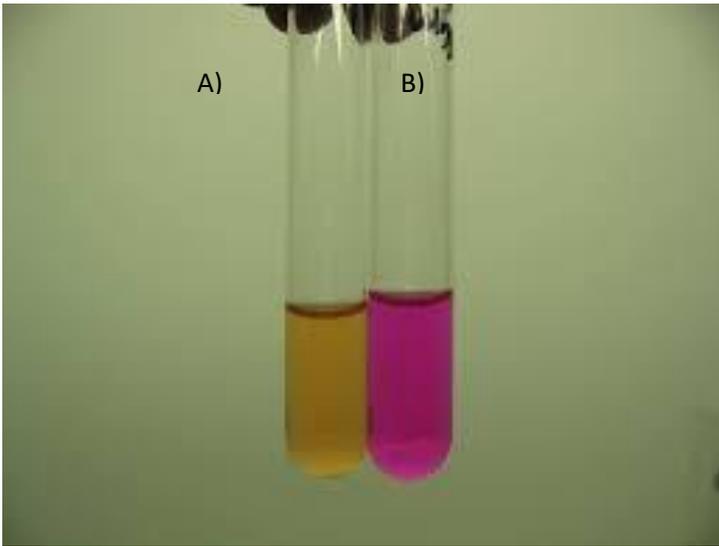


Figura 3A. caldo urea. A) prueba negativa B) prueba positiva

Fuente: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c\\_PruebasBioquimicas\\_17461.PDF](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c_PruebasBioquimicas_17461.PDF)

## MEDIO MIO

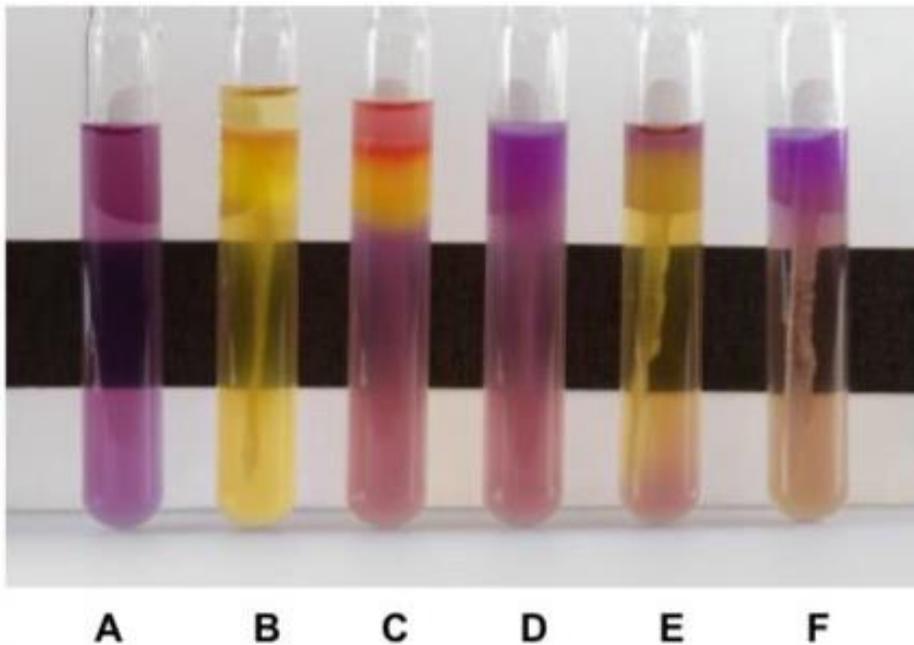


Figura 4A. Medio Mio. A: tubo sin inocular (control); B: indol negativo, motilidad negativa, ornitina negativa; C: indol positivo, ornitina positivo, motilidad positiva; D: motilidad positivo, ornitina positivo; E: motilidad negativa, ornitina negativo; F motilidad negativo, ornitina positivo.

Fuente: [https://twitter.com/100cia\\_/status/1071840757089267712](https://twitter.com/100cia_/status/1071840757089267712)

*MEDIO RM-VP*

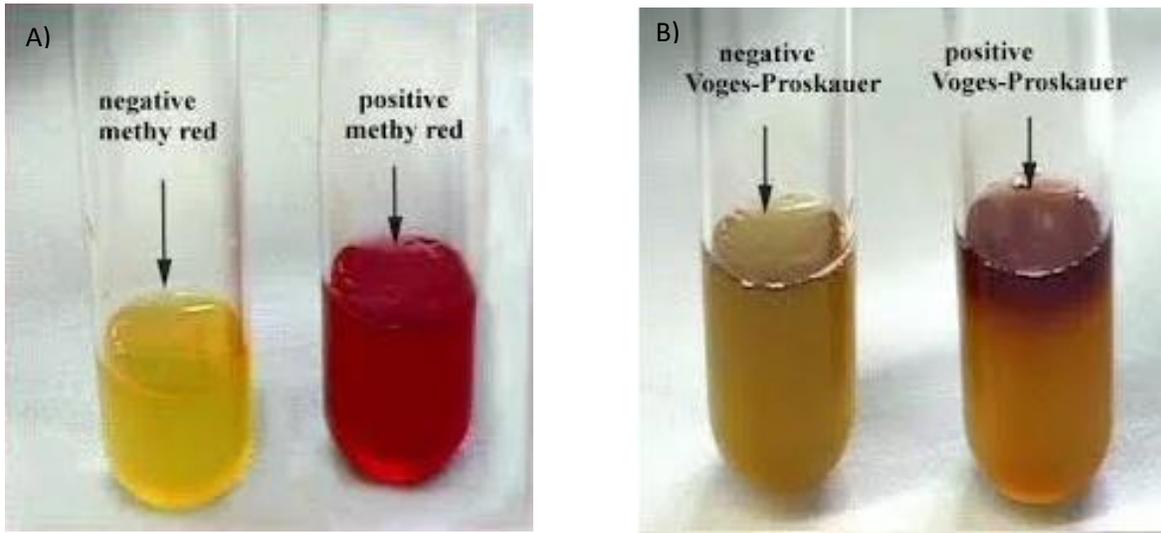


Figura 5A. Medio RM-VP. A) Test rojo de metilo; B) Test Voges Proskauer.  
Fuente: <https://sariitaa211.wixsite.com/medioscultivolcb1/mr-vp>

## ANEXO B PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA *Pseudomonas aeruginosa*

### DESAMINACIÓN DE ACETAMIDA



Figura 1B. Caldo acetamida. A) caldo sin inocular B) Reacción negativa, C) Reacción positiva  
Fuente: <https://www.medioscultivo.com/acetamide-broth-caldo-acetamida/>

### PRUEBA DE LA HIDROLISIS DE GELATINA

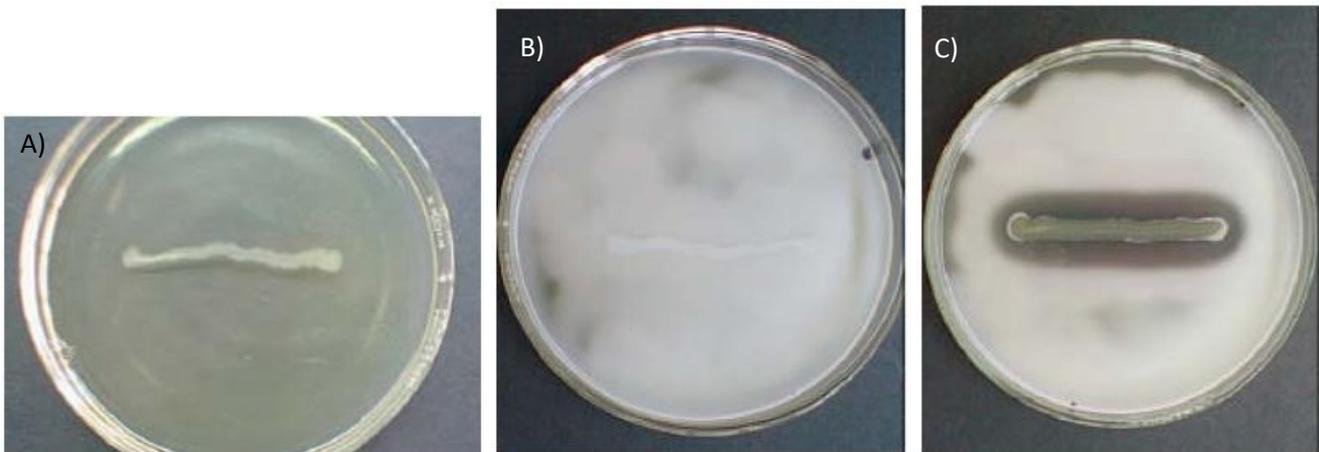


Figura 2B. Prueba de hidrolisis de gelatina en placa; A) medio gelatina nutritiva inoculado B) prueba negativa C) prueba positiva.

Fuente: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/gelatina.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/gelatina.pdf)

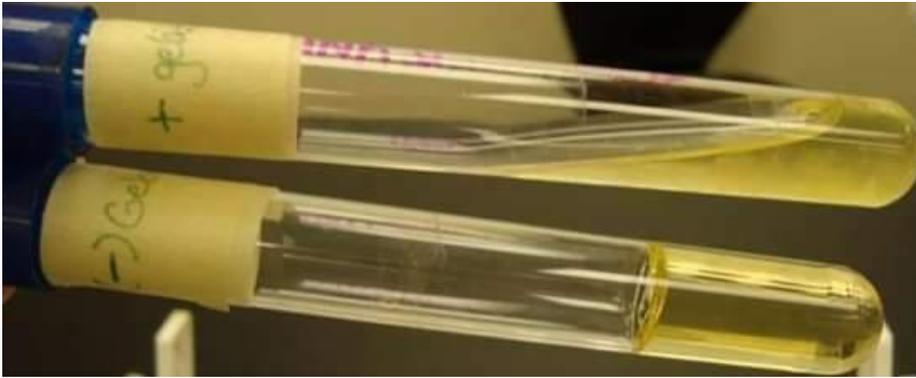


Figura 3B. Prueba de hidrólisis de gelatina en tubo.

Fuente <http://cienciasdelasaludnic.blogspot.com/2019/01/prueba-de-hidrolisis-de-gelatina.html>

### PRUEBA DE OXIDACIÓN/FERMENTACIÓN DE GLUCOSA

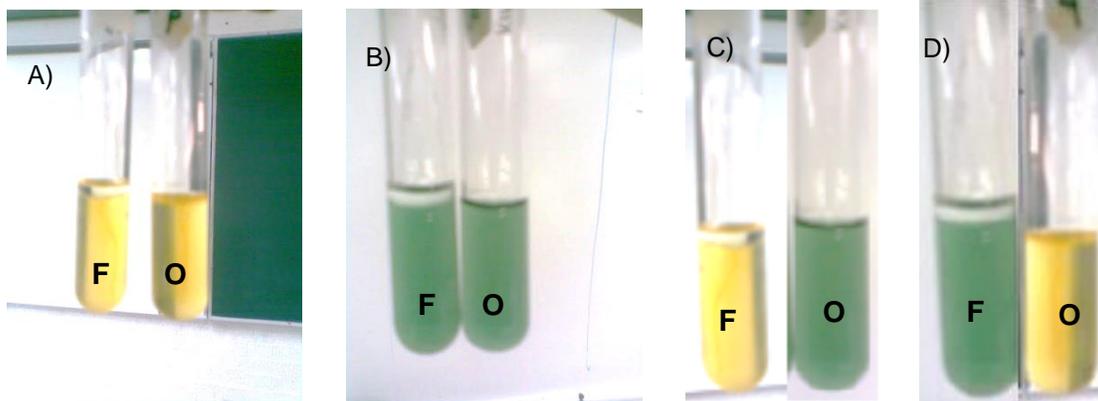


Figura 4B. Prueba OF de glucosa. A) microorganismo oxidativo y fermentador; B) microorganismo no oxidativo ni fermentador; C) microorganismo fermentativo; D) microorganismo oxidativo

Fuente: <http://microbitosblog.com/2011/09/27/pruebas-bioquimicas-primarias/>

### PRUEBA DE LA OXIDASA

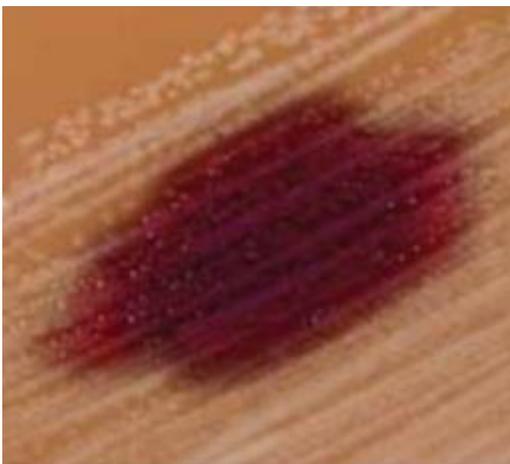


Figura 5B. prueba de la oxidasa. Método directo en placa.

Fuente: <https://www.pinterest.com.mx/pin/472455817131238226/>

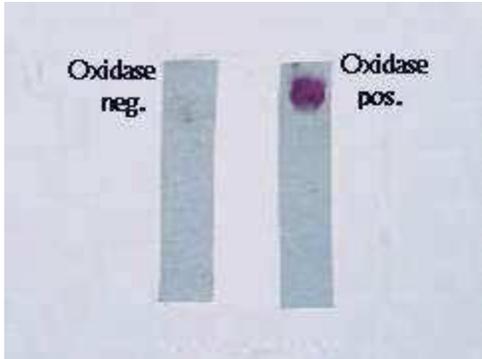


Figura 6B. Prueba de oxidasa. Método indirecto en tiras de papel. Método indirecto en disco

Fuente:

[https://www.inciensa.sa.cr/ensenanza/ensenanza\\_documentos/taller\\_colera/manuales%20y%20procedimientos%20de%20laboratorio/Recomendaciones%20generales%20para%20la%20vigilancia%20de%20laboratorio%20del%20colera.pdf](https://www.inciensa.sa.cr/ensenanza/ensenanza_documentos/taller_colera/manuales%20y%20procedimientos%20de%20laboratorio/Recomendaciones%20generales%20para%20la%20vigilancia%20de%20laboratorio%20del%20colera.pdf)



Figura 7B. Prueba de oxidasa. Método indirecto en disco

<https://vdocuments.mx/pruebas-bioquimicas-y-medios-de-cultivo-bacteriologia.html>

## REDUCCIÓN DE NITRATOS

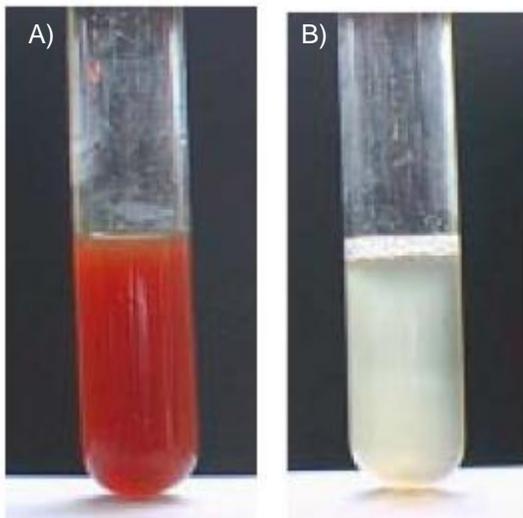


Figura 8B. Caldo nitrato. A) prueba positiva; B) prueba negativa

Fuente: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/nitratos.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/nitratos.pdf)

## ANEXO C

### PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA *Staphylococcus*

#### PRUEBA DE LA COAGULASA

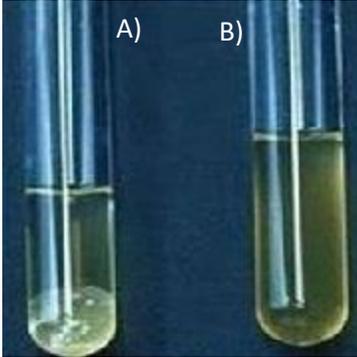


Figura 1C. Prueba de la coagulasa en plasma fresco. A) prueba positiva, B) prueba negativa.

Fuente: <http://identificacionbacterias.web16.top/index.php/cocos-gn/genero-brucella/53-pruebas/pruebas-staphylococcus/42-prueba-de-coagulasa>.

#### PRUEBA DE LA TERMONUCLEASA

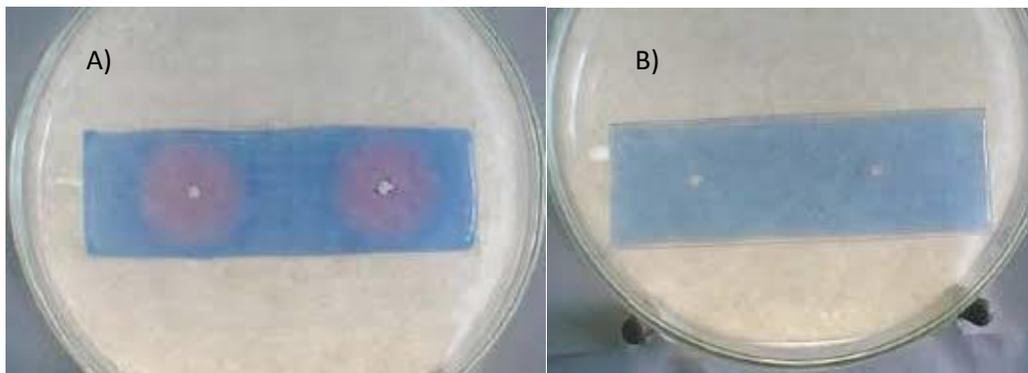


Figura 2C. Prueba de la termonucleasa en portaobjetos. A) Prueba positiva, B) Prueba negativa.

Fuente: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/nitratos.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/nitratos.pdf)



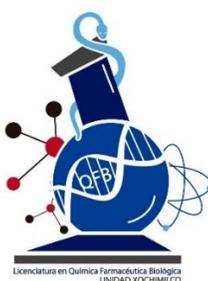
Casa abierta al tiempo

# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

## **UNIDAD XOCHIMILCO**

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

**LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**



### **MANTENIMIENTO DE LA COLECCIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL (resumen)**

**Nombre: Juárez Moscú David**

**Matrícula: 2162029747**

**Correo Electrónico: 2162029747@alumnos.xoc.uam.mx**

**Teléfono (casa): 5588477193**

**Teléfono (celular): 55 8477 7854**

**Asesores: M en C María Cristina Fresan Orozco**

**M en C Felipe Mendoza Pérez**

**Fecha de Inicio: 16 de febrero 2021**

**Fecha de Terminación: 16 de agosto 2021**

**Fecha de Entrega: 19 de agosto de 2021**

## INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en la agricultura y la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

Las 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 ciencias (Gutierrez-Jimenez, y otros, 2015). La disponibilidad de microorganismos de referencia para el desarrollo del trabajo constituyó la premisa básica que condicionó el surgimiento del laboratorio cepario, en la actualidad colección de cultivos microbianos (Weng Aleman, Junco Díaz, & Diaz Rosas, 2003).

Los cultivos de referencia se requieren para establecer el desempeño aceptable de los medios (incluidos los kits de ensayos), para validar métodos, verificar la aptitud de los métodos de ensayo y para determinar o evaluar el desempeño en curso. Para demostrar la trazabilidad, los laboratorios deben utilizar cepas de referencia de microorganismos obtenidas directamente de una colección nacional o internacional reconocida, cuando éstas existan (OMS, 2012). Por todo esto una colección de cultivos bien mantenida es un requisito indispensable para las buenas prácticas del laboratorio (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

En el Convenio sobre Diversidad Biológica, se ha reconocido que las colecciones microbianas deben preservar la diversidad biológica, facilitar el uso prolongado de sus componentes y distribuir equitativamente los beneficios obtenidos por usar dichos recursos. Así, es deseable que aquellas instituciones que se dediquen a la investigación promuevan el acopio y la preservación de los materiales biológicos (Gutierrez-Jimenez, y otros, 2015).

La preservación de los microorganismos de la colección debe garantizar su viabilidad en estado inactivo, puro y homogéneo, bajo condiciones que aseguren la estabilidad microscópica, macroscópica, bioquímica, fisiológica y genética, es decir, sin variaciones fenotípicas ni mutaciones con respecto a las condiciones originales (Gutierrez-Jimenez, y otros, 2015).

La mayoría de los métodos de preservación logran reducir el ritmo metabólico de los organismos por retención de nutrientes, agua y oxígeno; por reducción de la temperatura de conservación; o por combinación de ambos (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

Los criterios para la selección del método son la viabilidad, pureza, costos del proceso, cantidad de cultivo y frecuencia de uso. Según el periodo de tiempo, los métodos pueden ser de corto y largo plazo. Ente los métodos a corto plazo destaca la realización de subcultivos periódicos a medio fresco, este método presenta un incremento en la probabilidad de mutaciones. La conservación de microorganismos mediante ultracongelación y liofilización son métodos para preservación a largo plazo, también conocidos como métodos de elección. Con éstos se consigue interrumpir el crecimiento microbiano, pero manteniendo su viabilidad y estabilidad genética (Gutierrez-Jimenez, y otros, 2015).

En el método de conservación por congelación, se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales, y además existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento (García López & Uruburu Fernández, 2002).

Para el recobro de las células Cualquiera que haya sido el método empleado en la conservación de las cepas microbianas, cuando éstas se recuperan para hacer nuevos lotes para su conservación o para trabajar con ellas, se recomienda no utilizar directamente las células que se han estado guardando, porque éstas vienen de una situación de estrés más o menos fuerte (sobre todo cuando se han conservado por liofilización) y por lo tanto no son adecuadas para ningún tipo de prueba. Primero habría que revitalizarlas o rejuvenecerlas sembrándolas en

un medio no selectivo, es decir, un medio que asegure lo más posible el crecimiento, y a partir de este primer crecimiento ya se puede trabajar con ellas, cultivándolas en medios selectivos cuando sea necesario (Arencibia Arrebola, Rosario Fernández, & Gamez Méndez, 2008).

## OBJETIVOS

- Objetivo general
  - Conservar cepas Gram positivas y Gram negativas.
- Objetivos específicos
  - Reconstituir, activar, cultivar, identificar y criopreservar bacterias Gram positivas
  - Reconstituir, activar, cultivar, identificar y criopreservar bacterias Gram negativas

## METODOLOGÍA

La colección de cultivos microbianos del laboratorio de biología experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco cuenta actualmente con 22 especies bacterianas, agrupadas en los géneros: Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Pantoea, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Shigella y Staphylococcus. Las bacterias se conservan a -70°C en caldo infusión cerebro corazón (BHI) y glicerol (20%) como agente citoprotector.

## REACTIVACIÓN

Para la revitalización de la cepa se descongelan 2 viales (tubos eppendorf de 2 mL) a temperatura ambiente (sin utilizar medio externo de transferencia de calor) y se transfiere el contenido asépticamente a un tubo con 3 mL de caldo infusión cerebro corazón (HIB), un tubo por vial, e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h.

## IDENTIFICACIÓN

### BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

*Enterobacterias.*

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar MacConkey e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características, se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de por lo menos 2 de los siguientes medios: agar Entérico Hektoen, agar Salmonella-Shigella, agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato, agar Eosina-Azul de Metileno y agar Verde Brillante (salmonella se utiliza también el agar Sulfito de Bismuto), e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características, se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

En el caso de en Serratia, Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar Nutritivo o agar sangre e incubar en aerobiosis preferentemente a 28°C (también se puede incubar a 37°C) durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características, se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar MacConkey, e incubar en aerobiosis preferentemente a 28°C (también se puede incubar a 37°C) durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características, se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Para la identificación de las enterobacterias se utilizan los siguientes medios para pruebas bioquímicas: agar Citrato de Simmons, agar Hierro Triple Azúcar, caldo Urea, medio MIO, medio RM-VP, y los resultados se comparan con la tabla

El medio citrato de Simmons identifica si el organismo es capaz de usar el citrato como fuente de carbono, esta prueba debe ser inoculado en el pico de flauta usando asa recta o aguja, e incubarse durante 24 horas a 35-37°C. Culminado el tiempo se observan los resultados. El sembrado se realiza únicamente en la superficie del agar. No hacer punción.

El agar Hierro Triple Azúcar pone de manifiesto la fermentación de carbohidratos (glucosa, lactosa y sacarosa); producción de gas y producción de sulfuro de hidrogeno (H<sub>2</sub>S), el sembrado se realiza con un ansa recta o aguja. Se realiza una punción, cuidando que sea por el centro del medio hasta llegar al fondo, y luego se termina el sembrado inoculando la superficie en forma de zigzag. No hacer dos punciones. Incubar a 37°C en aerobiosis por 18-24 horas. Interpretar en este tiempo.

En el caldo urea se observa la presencia de ureasa. Para la siembra de la prueba se transfiere una asada del cultivo puro a un tubo con caldo urea, se emulsiona en el medio líquido y se incuba a 37°C por 24 a 48 horas.

En el medio MIO se observa si la bacteria presenta movilidad (M), producción de Indol por la presencia de triptofanasa (I), y la presencia de ornitina descarboxilasa (O).

Para sembrar el medio MIO se utiliza un asa recta o aguja y con ella se recoge una porción de la colonia a estudiar. Se hace una punción profunda en el medio MIO en línea recta. No es recomendable realizar doble punción, ya que puede dar falsa imagen de motilidad si las punciones no se realizan en el mismo sitio. Incubar durante 24 a 48 horas a 37°C en aerobiosis. Observar los resultados en este orden: motilidad, descarboxilación de la ornitina y por último revelar el indol.

Es aconsejable sacar de forma aséptica 2 ml del medio, trasvasarlo a un tubo estéril y realizar allí la prueba del indol, de manera que si da negativa se pueda incubar el resto del tubo original durante 24 horas más, para revelar nuevamente el indol.

El revelado del indol se realiza de la siguiente manera: se agregan 3 a 5 gotas del reactivo de Kovacs en el medio MIO y se agita fuertemente. Se observa si aparece o no un anillo de color rojo fucsia.

En el medio RM-VP se realiza el test de Voges-Proskauer (VP) que revela la capacidad del microorganismo de formar acetil metil carbinol (acetoína), así como el test de rojo de metilo (RM) que mide la capacidad del microorganismo de producir ácidos por la vía de los ácidos mixtos. Para realizar ambos test se inocula un caldo RM/VP con el microorganismo en estudio, a partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas. El inóculo no debe ser muy denso. Se incuba a 35-37°C por 24 a 48 horas, aunque en ocasiones es necesaria la incubación por varios días.

#### *Revelado del Test Voges-Proskauer*

Separar una alícuota de 1 mL en un tubo y realizar el revelado de la siguiente manera: coloque 12 gotas (0,6 mL) del reactivo Voges A y 4 gotas (0,2 ml) de Voges B. Mezcle para airear y deje reposar por 5 – 10 minutos antes de interpretar. Sin embargo, si la prueba aún está negativa deje reposar y observe el tubo al cabo de 30 minutos a 1 hora.

#### *Revelado del Test de Rojo de Metilo*

Separar una alícuota de 1 mL en un tubo y agregar unas gotas del indicador de pH rojo de metilo. Mezclar y observar el color.

	IND	RM	VP	CS	H <sub>2</sub> S	URE	ORN	MOT	FL	FG	GAS
<i>Citrobacter freundii</i>	-/+	+	-	+/-	+/-	-/+	-	+/-	A o K	A	+/-
<i>Citrobacter rodentium</i>	-	+	-	-	-	+	+	-	A	A	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+	-	-	+	+	A	A	++
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	-	+/-	+	A	A	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	+	-	-	A	A	++
<i>Pantoea agglomerans</i>	-/+	-/+	+/-	+/-	-	-/+	-	+	K o A	A	-/+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	+/-	+/-	+	++	+	+	K	A	+
<i>Salmonella tify</i>	-	+	-	-	+	-	-	+	K	A	-
<i>Salmonella tiphymorium</i>	-	+	-	+	+	-	+	+	K	A	+
<i>Serratia marcescens</i>	-	-/+	+	+	-	-/+	+	+	K	A	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	-/+	+	-	-	-	-	-	-	K	A	-
<i>Shigella flexneri</i>	-/+	+	-	-	-	-	-	-	K	A	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	K	A	-
<i>Shigella spp</i>	-/+	+	-	-	-	-	-	-	K	A	-

**Tabla 11.** Comportamiento bioquímico de enterobacterias. IND: indol; RM: rojo de metilo; VP: Voges-Proskauer; CS: Citrato de Simmons; H<sub>2</sub>S: Sulfuro de hidrogeno; URE: Hidrolisis de urea; ORN: Ornitina descarboxilasa; MOT: Motilidad; FG: Fermentadores de glucosa; FL: Fermentadores de lactosa; GAS: Producción de gas; +/-: 50-90% de cepas negativas; +/-: 50-90% de cepas positivas; ++ reacción intensa.

Fuente: Koneman, *Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas a color (6a ed.)*.

### *Pseudomona aeruginosa*

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar sangre e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características, se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar cetrimida e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características, se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Para la identificación de *P. aeruginosa* se realizan las pruebas: desaminación de acetamida, hidrólisis de gelatina, Prueba de O/F, prueba de la oxidasa y reducción de nitratos; los resultados se comparan con la tabla 13

	Desaminación de acetamida	Hidrolisis de gelatina	Prueba O/F	Prueba de la oxidasa	Reducción de nitratos
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Positivo	Positivo	Oxidador de glucosa (tubo abierto amarillo y el sellado verde o azul)*	Positivo	Nitratos Positivo Gas Positivo**

**Tabla 13.** Comportamiento bioquímico de *Pseudomona aeruginosa*.

Fuente: Koneman, *Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas a color (6a ed.)*. \*lifeder.com, \*\*condalab.com

La desaminación de Acetamida mide la capacidad del microorganismo para la utilización acetamida como fuente de carbono. Inocular un tubo de caldo Acetamida con uno o dos asadas de cultivo puro e Incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 2-4 días. Una reacción positiva produce una coloración en el medio de un intenso rojo púrpura (Condalab, 2019)

La Hidrolisis de gelatina se utiliza para investigar la presencia de microorganismos proteolíticos, como lo demuestra la licuefacción de la gelatina. Esta prueba se puede realizar por dos métodos.

#### Método 1

- Inocular los tubos punzando con una aguja (alambre recto) e incubara  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 7 días, o hasta 15 días si es necesario.
- Refrigerar los cultivos junto con un tubo de control de gelatina nutritiva no inoculado y leer las reacciones tan pronto como el tubo de control se haya endurecido invirtiendo el tubo.
- La detección de proteólisis se observa al permanecer líquido el medio de cultivo.

#### Método 2

- Inocular las placas de gelatina nutritiva mediante una estría en la superficie e incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 a 7 días. Comprobar la hidrólisis de la gelatina en la placa agregando una gota de sulfato de amonio saturado o ácido sulfosalicílico al 20% a una colonia aislada. Buscar una zona clara alrededor de la colonia (reacción de Stone) después de 10 minutos.

La Prueba de Oxidación/Fermentación de glucosa detecta si el microorganismo utiliza los carbohidratos por vía fermentativa o por la vía oxidativa

Para cada microorganismo se necesitan 2 tubos de medio OF, ambos deben ser inoculados con el microorganismo a estudiar. Se toma la colonia con un asa recta y se hace una punción en el centro del tubo sin llegar al fondo; se pueden hacer varias punciones, siempre y cuando no interese observar motilidad.

A uno de los tubos se le agrega una capa de vaselina líquida estéril o parafina fundida estéril (1 a 2 ml aproximadamente) y se rotula con la letra «F». El otro tubo se deja original y se rotula con la letra «O». Se incuban ambos tubos a  $35^\circ\text{C}$  y se observa diariamente hasta por 3 a 4 días.

La Prueba de la oxidasa evidencia la presencia del complejo enzimático denominado citocromo oxidasa c. Esta prueba se puede realizar por el método de placa directa, métodos indirectos sobre papel o método de discos directo o indirecto.

#### Método de la placa directa

- Se adicionan 2 o 3 gotas de cualquiera de los reactivos antes mencionados para este fin directamente sobre la(s) colonia(s) contenidas en una placa de medio de cultivo que no contenga glucosa. Se interpreta el cambio de color de las colonias, no del medio. El tiempo de reacción válido depende del reactivo utilizado (Lifeder, 2019).

#### Método indirecto sobre papel filtro

- Cortar un trozo de papel de filtro (Whatman N°1) a un tamaño de 6 cm<sup>2</sup> y se coloca dentro de una placa de Petri vacía. Adicionar 2 o 3 gotas del reactivo de oxidasa de Kovacs en el papel, tomar parte de la colonia que se quiere estudiar con un asa de platino o palillo de madera y extenderla en línea recta sobre el papel impregnado de reactivo. Interpretar en un lapso de 5 a 10 segundos (Lifeder, 2019).

#### Discos (método directo)

- Humedecer sutilmente los discos comerciales con agua destilada estéril y sobreponer sobre la colonia a estudiar. Se recomienda usar las placas a 35°C, si se usan placas a temperatura ambiente o placas refrigeradas la reacción es un poco más lenta. Interpretar el cambio de color entre 10 a 20 segundos (Lifeder, 2019).

#### Discos (método indirecto)

- Humedecer el disco como se describió anteriormente. Colocarlo en una placa de Petri vacía. Tomar cantidad suficiente de la colonia a estudiar con un asa de platino o palillo de madera y colocar sobre el disco. Interpretar el cambio de color entre 10 a 20 segundos (Lifeder, 2019).

La prueba de Reducción de nitratos identifica el uso de nitratos por el microorganismo. Para la siembra de la prueba se transfiere una asada del cultivo puro a un tubo con caldo Nitrito, se añade un tubo de Durham para observar la producción de gas y se incuba a 35°C por 12 a 24 horas (Condalab, 2019).

Para determinar si el nitrato ha sido reducido a nitrito, después de la incubación, se añade al medio de cultivo, 2 gotas de solución A, y luego 2 gotas de la solución B del reactivo de Griess y se mezcla. La aparición de una coloración rosada o roja indica que los nitratos han sido reducidos a nitritos (Universidad Central de Venezuela, 2017).

## BACTERIAS GRAMPOSITIVAS

### *Staphylococcus*

#### Método 1

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar sangre e incubar en aerobiosis a 37°C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características, se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Con las colonias identificadas, se realiza la siembra mediante estría cruzada en placas de agar sal manitol e incubar en aerobiosis a 37° C durante 18-24 h. Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características, se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

#### Método 2

Después de reactivar las cepas, se realiza la siembra de placas de agar Baird-Parker depositando 0.1-0.5 mL de cultivo en BHI y distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, se mantienen las placas en la posición hasta que se absorba el inóculo y se incuban en aerobiosis a 35°C durante 45-48 h (NOM-115-SSA1-1994, 1995). Pasado el tiempo, a las placas que presenten crecimiento se describe la morfología colonial e identifican colonias características, se les realiza tinción Gram y se observan al microscopio.

Para la identificación de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* se realizan las pruebas de la coagula, term nucleasa y fermentación de manitol, y los resultados se comparan con la tabla 16

	Prueba de la coagulasa	Prueba de la termonucleasa	Fermentación de manitol
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo	Negativo	Negativo

**Tabla 16.** Comportamiento bioquímico de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Fuente: Koneman, *Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas a color* (6a ed.).

La Prueba de la Coagulasa se utiliza para poner en evidencia la presencia de la enzima coagulasa. Permite diferenciar *S. aureus* del resto de los estafilococos, esta prueba se puede realizar en porta objetos y en tubo (Lifeder, 2019).

Prueba de la coagulasa en portaobjetos (Lifeder, 2019).

- En un portaobjeto se coloca una gota de solución salina y una gota de plasma fresco de forma separada.
- Con un asa se toman 1 o 2 colonias puras del microorganismo a probar.
- Se mezcla la carga bacteriana en la gota de plasma y repita la operación en la gota de Solución Salina Fisiológica (SSF). Observe los resultados de forma inmediata. Un resultado positivo será aquel en donde se observe la formación de un aglutinado macroscópico (precipitado blanco) al cabo de un minuto del lado de la gota con plasma.
- La gota de SSF sirve de control negativo. Si se observa aglutinación con la SSF, esto quiere decir que el microorganismo se auto-aglutina, pudiendo proporcionar resultados falsos positivos. En este caso se debe corroborar con la prueba en tubo.

Prueba de la coagulasa en tubo (Lifeder, 2019).

- Con una pipeta estéril se miden 0,5 mL de plasma fresco y se coloca en un tubo de ensayo estéril de 12 x 75. Con el asa se toman 2 a 4 colonias puras a estudiar provenientes de un cultivo sólido de 18 a 24 horas y se disuelven en el plasma cuidadosamente, mezclar e incubar a 37°C por 4 horas.
- Examinar el tubo a la primera hora sin agitarlo, solo incline suavemente. Si aún no se observa coágulo, se puede seguir observando cada 30 minutos hasta completar las 4 horas. Si después de 4 horas aún sigue negativo se puede dejar hasta por 24 horas, pero a temperatura ambiente. Observar y reportar el resultado.

Para la prueba de la Termonucleasa se debe Calentar durante 15 min, 0,3 ml de cultivo en caldo de infusión cerebro-corazón en baño de agua hirviendo. Pasar una gota de cada cultivo por medio de una pipeta Pasteur a un orificio del medio. Incubar a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24 h. La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación se califica como positiva (NOM-115-SSA1-1994, 1995)

## CONSERVACIÓN POR CONGELACIÓN

Con la bacterias bien identificada por pruebas bioquímicas, se toma una colonia y se siembra por agitación en un tubo con 8 mL de caldo infusión cerebro corazón, y se incuba en aerobiosis a 37°C por 18-24 horas, posteriormente se agregan 2 mL de glicerol al 20%, y se homogeniza con agitación en vórtex, y se distribuyen 2 mL en tubos eppendorf, se identifican colocando el nombre del microorganismo, fecha de conservación y nombre del analista. Por último, los tubos se colocan en un frasco y se identifica de la misma forma que los tubos, y se colocan en congelación a -70°C.

## CONCLUSIÓN

El mantenimiento de la colección de cultivos microbianos es una de las tareas de gran importancia en un laboratorio en el que se lleva a cabo investigación, sobre todo cuando se trata de cultivos de referencia, ya que un manejo inadecuado puede dar lugar a mutaciones importantes en la cepa, como cambios en el metabolismo bacteriano y resistencia antimicrobiana; estas mutaciones interfieren en los resultados de los ensayos, dando falsos positivos o

negativos, lo que se traduce en la disminución de la fiabilidad de los resultados del laboratorio y la consecuente pérdida en la investigación.

Por esta razón se opta por métodos de conservación a largo plazo, como la ultracongelación y liofilización, ya que en ellos se interrumpe la actividad metabólica, crecimiento y proliferación, pero conservando la viabilidad y estabilidad genética de las células, evitando mutaciones importantes y asegurando que el cultivo se encuentre lo más próximo al aislamiento original.

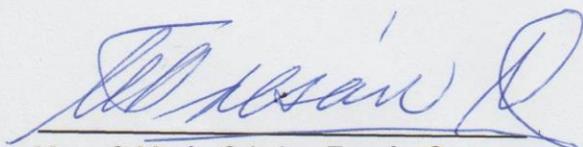
## **OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS**

Debido a la emergencia sanitaria en la que nos encontramos por efecto de la pandemia los objetivos y las metas propuestas en el documento no se alcanzaron debido a que la parte experimental se tuvo que suspender, por lo que se optó por realizar una revisión bibliográfica del proceso que se debe seguir para el mantenimiento de una colección de cultivos microbianos. En ella se tomaron en consideración los recursos con los que cuenta el laboratorio de biología experimental. Por lo que este documento puede tomarse como base para que cuando la emergencia sanitaria se levante, pueda llevarse de a cabo la parte experimental.

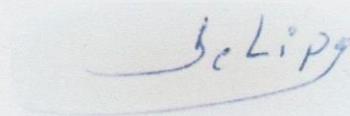
## BIBLIOGRAFÍA

- Arencibia Arrebola, D. F., Rosario Fernández, L. A., & Gamez Méndez, R. (2008). *Métodos generales de conservación de microorganismos*. Finlay Ediciones.
- Centro Nacional de Referencia de Bacteriología. (2013). *Recomendaciones generales para la vigilancia de laboratorio del cólera en las diarreas*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de <http://www.inciensa.sa.cr/Inciensa>:  
[https://www.inciensa.sa.cr/ensenanza/ensenanza\\_documentos/taller\\_colera/manuales%20y%20procedimientos%20de%20laboratorio/Recomendaciones%20generales%20para%20la%20vigilancia%20de%20laboratorio%20del%20colera.pdf](https://www.inciensa.sa.cr/ensenanza/ensenanza_documentos/taller_colera/manuales%20y%20procedimientos%20de%20laboratorio/Recomendaciones%20generales%20para%20la%20vigilancia%20de%20laboratorio%20del%20colera.pdf)
- Ciencias de la salud. (2019). *PRUEBA DE HIDROLISIS DE GELATINA*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de [cienciasdelasaludnic.blogspot.com](http://cienciasdelasaludnic.blogspot.com): <http://cienciasdelasaludnic.blogspot.com/2019/01/prueba-de-hidrolisis-de-gelatina.html>
- El Aila, N. (2014). *Enterobacteriaceae II biochemical reaction*. Recuperado el 26 de julio de 2020, de [slideshare.net](https://www.slideshare.net):  
<https://www.slideshare.net/anwarsh148/enterobacteriaceae-ii-biochemical-reaction-2>
- Facultad de Química UNAM. (2014). *Pruebas Bioquímicas*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de [depa.fquim.unam.mx](http://depa.fquim.unam.mx): [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/10\\_PruebasBioquimicas\\_27069.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/10_PruebasBioquimicas_27069.pdf)
- Facultad de Química UNAM. (2014). *Pruebas Bioquímicas*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de [depa.fquim.unam.mx](http://depa.fquim.unam.mx):  
[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c\\_PruebasBioquimicas\\_17461.PDF](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c_PruebasBioquimicas_17461.PDF)
- García López, M. D., & Uruburu Fernández, F. (2002). La conservación de cepas microbianas. *Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Temas de actualidad, 30*, 12-16. Valencia, Valencia, España: Universitat de València.
- Gutierrez-Jimenez, J., Luna-Cazás, 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.
- Lifeder. (2019). *Agar citrato de Simmons: fundamento, preparación y uso*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de [lifeder.com](https://www.lifeder.com): <https://www.lifeder.com/agar-citrato-de-simmons/#Inoculo>
- Lifeder. (2019). *Agar sulfito de bismuto: fundamento, preparación y usos*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de [lifeder.com](https://www.lifeder.com): <https://www.lifeder.com/agar-sulfito-de-bismuto/>
- Lifeder. (2019). *Agar TSI: fundamento, preparación y usos*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de [lifeder.com](https://www.lifeder.com): <https://www.lifeder.com/agar-tsi/>
- Lifeder. (2019). *Caldo Urea: fundamento, preparación y usos*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de [lifeder.com](https://www.lifeder.com): <https://www.lifeder.com/caldo-urea/>
- Lifeder. (2019). *Medio MIO: fundamento, preparación y usos*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de [lifeder.com](https://www.lifeder.com): <https://www.lifeder.com/medio-mio/>
- Lifeder. (2019). *Prueba de la coagulasa: fundamento, procedimiento y usos*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de [lifeder.com](https://www.lifeder.com): <https://www.lifeder.com/prueba-de-la-coagulasa/>
- Lifeder. (2019). *Prueba de oxidasa: fundamento, procedimiento y usos*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de [lifeder.com](https://www.lifeder.com): <https://www.lifeder.com/prueba-de-oxidasa/>
- Lifeder. (2019). *Rojo de metilo: características, preparación y aplicaciones*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de [lifeder.com](https://www.lifeder.com): [https://www.lifeder.com/rojo-de-metilo/#En\\_la\\_prueba\\_rojo\\_de\\_metilo](https://www.lifeder.com/rojo-de-metilo/#En_la_prueba_rojo_de_metilo)
- Lifeder. (2019). *Serratia marcescens: características, patología y síntomas*. Recuperado el 20 de julio de 2020, de [lifeder.com](https://www.lifeder.com): [https://www.lifeder.com/serratia-marcescens/#Caracteristicas\\_generales\\_y\\_condiciones\\_de\\_crecimiento](https://www.lifeder.com/serratia-marcescens/#Caracteristicas_generales_y_condiciones_de_crecimiento)
- Lifeder. (2019). *Test Voges-Proskauer: fundamento, preparación y usos*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de [lifeder.com](https://www.lifeder.com): <https://www.lifeder.com/test-voges-proskauer/>

- Microbiología para bioanálisis. (2012). *Prueba Oxidación-Fermentación (OF)*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de [microbiologiabioanalisis.blogspot.com: http://microbiologiabioanalisis.blogspot.com/2012/07/prueba-oxidacion-fermentacion-of.html](http://microbiologiabioanalisis.blogspot.com/2012/07/prueba-oxidacion-fermentacion-of.html)
- Microbitos, G. (2011). *Pruebas bioquímicas primarias: Tinción de GRAM, prueba de catalasa, prueba de oxidasa, prueba de O/F y motilidad*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de [microbitosblog.com: http://microbitosblog.com/2011/09/27/pruebas-bioquimicas-primarias/](http://microbitosblog.com/2011/09/27/pruebas-bioquimicas-primarias/)
- NOM-115-SSA1-1994. (1995). *BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN ALIMENTOS*. Ciudad de Mexico: Diario Oficial de la Federación.
- OMS. (Enero de 2012). *Buenas Practicas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica. Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación farmacéutica*. Washington, DC.
- Terzolo, H. R. (s.f.). *Parte 3 Aislamiento. Producción animal, Bacteriología*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de [docplayer.es: https://docplayer.es/53633144-Parte-3-aislamiento-dr-horacio-raul-terzolo-produccion-animal-bacteriologia.html](https://docplayer.es/53633144-Parte-3-aislamiento-dr-horacio-raul-terzolo-produccion-animal-bacteriologia.html)
- Universidad Central de Venezuela. (2017). *Hidrolisis de la gelatina*. Obtenido de [ucv.ve: http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/gelatina.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/gelatina.pdf)
- Universidad Central de Venezuela. (2017). *PRODUCCIÓN DE NUCLEASA TERMOESTABLE (TERMONUCLEASA)*. Recuperado el 25 de julio de 2020, de [ucv.ve: http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/termoestable.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/termoestable.pdf)
- Universidad Central de Venezuela. (2017). *REDUCCIÓN DE NITRATOS Y DENITRIFICACIÓN*. Recuperado el 21 de julio de 2020, de [ucv.ve: http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/nitratos.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/nitratos.pdf)
- Weng Aleman, Z., Junco Díaz, R., & Diaz Rosas, O. (2003). Colección de cultivos microbianos: Apuntes sobre su desarrollo. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 4(1).
- Winn, W., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2008). *Koneman, Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas a color* (6a ed.). Ciudad de México: Editorial Medica Panamericana.



M en C María Cristina Fresán Orozco  
No Económico 3829



M en C Felipe Mendoza Pérez  
No Económico 7183