

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

PRESERVACIÓN DE *Staphylococcus*, *Streptococcus* Y
Micrococcus EN DISCOS DE AGAR

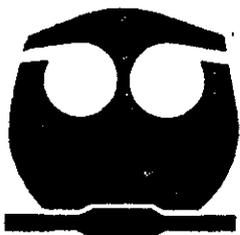
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :

ALICIA MIRANDA GUERRA



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27 9653



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente	Profra. Olga Velázquez Madrazo.
Vocal	Profra. Aurora Irma Ortegón Ávila.
Secretario	Profr. Luciano Hernández Gómez.
1er. Suplente	Profra. Ruth Edith Martín Fuentes.
2do. Suplente	Profr. Antonio Castillo Durán.

Sitio donde se desarrolló el tema: Cepario de la Facultad de Química.

Biol. Luciano Hernández Gómez.



Asesor

Alicia Miranda Guerra.



Sustentante

VIVIR NO ES SÓLO EXISTIR
SINO EXISTIR Y CREAR,
SABER SUFRIR Y GOZAR,
Y EN VEZ DE DORMIR,
SOÑAR.

ANÓNIMO

ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO:

A DIOS POR DARME LA FUERZA Y LA VOLUNTAD NECESARIAS, PARA
CULMINAR MIS ESTUDIOS.

A MIS PADRES, AMELIA Y FAUSTO, POR SU AMOR, COMPRENSIÓN Y POR
HABER INCULCADO EN MÍ, LOS VALORES DE LA RESPONSABILIDAD,
HONESTIDAD Y AMOR AL ESTUDIO.

A MIS HERMANOS ANTONIO, LUZ MARÍA Y DANIEL, POR CUIDARME Y
APOYARME EN TODO MOMENTO.

A MIS CUÑADOS CARMEN Y CHEVO, ESPECIALMENTE A ÉSTE ÚLTIMO, POR
AUXILIARME Y GUIARME EN MIS DECISIONES.

A MIS SOBRINOS LUIGI, KALA, LUPITA Y GABY, POR SU CARIÑO Y POR LOS
MOMENTOS DE DIVERSIÓN QUE JUNTOS DISFRUTAMOS.

A MI TÍO BARDO, POR PREPARARME EL DESAYUNO O LA CENA,
DURANTE MIS ESTUDIOS EN LA UNIVERSIDAD.

A MIS INCONDICIONALES AMIGAS, RUBICITA Y MARCELA ("SUPER BESTY"),
POR COMPARTIR CONMIGO MOMENTOS INOLVIDABLES,
PERO SOBRE TODO POR BRINDARME SU AMISTAD.

A MI ASESOR DE TESIS, JEFE Y AMIGO, BIOL. LUCIANO HERNÁNDEZ, CON
UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL, POR SU ORIENTACIÓN, CONFIANZA,
PACIENCIA Y AMISTAD.

A LA PROFRA. MA ANTONIETA, MIMÍ, MARIBEL, SRA. LUPITA Y
COMPAÑERAS DEL SERVICIO SOCIAL DEL CEPARIO, POR SU GRAN AYUDA
EN LA ELABORACIÓN DE ÉSTA TESIS.

INDICE

INTRODUCCION

1.	GENERALIDADES	pág.
1.1.	Importancia de la preservación de microorganismos.	1
1.2.	Criterios para elegir el Método de preservación.	3
1.3.	Factores que influyen en los procesos de preservación.	7
1.4.	Agentes crioprotectores.	16
1.5.	Métodos de Preservación.	21
	1 5.1 Métodos de preservación de corto plazo.	22
	1 5.2 Métodos de preservación de mediano plazo.	25
	1.5 3 Métodos de preservación de largo plazo.	32
1.6.	Métodos para el control de calidad.	43
1.7	Microorganismos utilizados.	46
	1 7.1 <i>Staphylococcus</i>	48
	1.7.2 <i>Streptococcus</i>	57
	1.7.3 <i>Micrococcus</i>	70
	1 7.4 <i>Leuconostoc</i>	73
2.	PARTE EXPERIMENTAL	
2.1	Material.	
	2.1.1 Material de laboratorio.	76
	2.1.2 Equipo.	76
	2.1.3 Material Biológico.	78
	2.1.4 Medios de Cultivo.	78
	2 1.5 Reactivos.	79
2.2	Métodos.	
	2.2.1 Reactivación de cepas	80
	2.2 2 Comprobación de pureza y viabilidad.	81
	2.2.3 Identificación y Certificación.	82

	pág	
2.2.4	Preservación.	92
2.2.4.1	Secado en discos de agar.	92
2.2.4.2	Liofilización.	96
2.2.5	Control de Calidad.	99
2.2.4	Análisis estadístico.	100
3.	RESULTADOS.	102
4.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.	123
5.	CONCLUSIONES.	131
6.	BIBLIOGRAFIA	133
7.	ANEXOS	138

INTRODUCCION

Luis Pasteur, químico y microbiólogo francés, considerado "el padre de las ciencias biológicas", fue el primer poseedor de una colección de cepas microbianas, mediante su almacenaje en medios líquidos. Posteriormente con el descubrimiento de los medios sólidos (papa, suero coagulado, agar), por Roberto Koch, se logró aislar y conservar cultivos puros a partir de una sola célula.

A través del tiempo se han desarrollado procedimientos para almacenar microorganismos por varios meses y hasta años, utilizando métodos diversos, como. refrigeración, inmersión bajo una capa de aceite mineral, desecación, congelación, etc , pero la mayoría de las veces ocurrían contaminaciones, mutaciones y eventualmente se perdía el cultivo. En la actualidad existe una gran variedad de métodos de preservación que pueden ser aplicados, sin causar contaminación, pérdida de viabilidad ó cambios genéticos en los cultivos. Dichos métodos permiten que las cepas puedan emplearse en laboratorios que necesitan de cultivos puros para diversos propósitos, como ocurre en los de enseñanza, investigación, industriales, clínicos, taxonómicos, etc. Sin embargo aún no existe un método universal de preservación que pueda ser aplicado a todos los microorganismos y cultivos celulares, por la razón de que los grupos taxonómicos exhiben diferencias significativas en su respuesta a los procesos a los que son sometidos durante su preservación y reactivación.

Por lo citado anteriormente el propósito de la presente tesis es el proporcionar un método de preservación alternativo (secado en discos de agar) para *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* y *Leuconostoc*, que sea de bajo costo, que el material y equipo empleado se tenga en cualquier laboratorio, que la técnica a seguir sea sencilla y no requiera de personal especializado, que para el almacenaje no ocupe grandes espacios o condiciones determinadas, y por supuesto que no dañe al microorganismo a preservar. Todo ello, debido a que tales microorganismos ya han sido preservados mediante liofilización con excelentes resultados, pero dado el elevado costo en material, equipo y personal que requiere este último método, se propone el secado en discos de agar. Además el uso continuo que presentan dichos cultivos, hace más recomendable el

empleo de métodos de preservación de mediano plazo, como el que se propone, aparte del de largo plazo, que es la liofilización. Por otro lado, el tener dos métodos de preservación aplicables a determinado grupo de microorganismos, evita pérdidas irreparables de las cepas, en caso de que alguno de los dos métodos empiece a ocasionar cambios morfológicos, fisiológicos o genéticos en los cultivos. También es importante mencionar, que el método de preservación propuesto se aplica a tales grupos de microorganismos, por el gran interés que presentan en los programas de Enseñanza de la Facultad de Química, tanto en docencia como en investigación, dada la importancia médica que poseen, en el campo clínico.

Para la elaboración del método propuesto, se realizó una investigación bibliográfica de los microorganismos empleados, para conocer propiedades que les permitieran soportar las condiciones drásticas de preservación, como por ejemplo, el ser microorganismos aerobios, y gram-positivos, o presentar forma cocoide, todas estas características hacen más resistentes a los microorganismos, a procesos de desecación y congelamiento, comparándolos con bacterias gram-negativas. También se revisaron métodos de preservación, sus variantes, ventajas y desventajas, a que grupos de microorganismos habían sido aplicados, agentes crioprotectores, así como los factores que influyen en el éxito o fracaso de la preservación, todo ello, para la elaboración de la técnica y composición del medio de soporte. Dicha información se incluye no sólo como marco teórico de la tesis, sino, para proporcionar material didáctico útil y de fácil acceso para los estudiantes de la Facultad de Química que estén interesados en el tema de preservación de microorganismos ó en la investigación de los microorganismos preservados.

Para este estudio se partió de la certificación de los microorganismos (cepas) mencionados anteriormente, presentes en el Cepario de la Facultad de Química y de la identificación de otros procedentes del Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ), Instituto Nacional de Pediatría (INP) y el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Posteriormente se propagaron y preservaron por secado en discos de agar y por liofilización. Una vez preservados, se almacenaron por un período de ocho meses, durante el cual se evaluó mensualmente la viabilidad, pureza y estabilidad de los cultivos preservados. Para el registro de la información referente a las características

morfológicas, microscópicas y macroscópicas, y bioquímicas, medios de cultivo, períodos de incubación, procedimientos de preservación, procedencia de los cultivos, etc , se diseñó un formato que abarcara todos los datos útiles para este trabajo de investigación y otros posteriores que incluyan a los grupos de microorganismos con los cuales se trabajó, además, dicha recopilación de datos servirá para conformar un registro más completo, ordenado y actualizado sobre las características de identificación de la colección de cultivos microbianos con la que cuenta el Cepario de la Facultad de Química.

1 GENERALIDADES

1.1 Importancia de la preservación de microorganismos

El empleo de microorganismos tiene gran importancia en el desarrollo de la investigación, la docencia y la industria; tan es así, que desde 1880, han existido investigadores e instituciones que se han dedicado al cuidado, mantenimiento y preservación de cultivos de microorganismos.¹⁵

La habilidad para preservar satisfactoriamente diversos grupos de microorganismos y cultivos celulares ha sido el logro principal de la Biología en el siglo pasado, ya que, la necesidad para conservar material biológico como: glóbulos rojos y cultivos microbianos primordialmente, se acrecentó cada día, y esto proporcionó un fuerte estímulo para la investigación de los principios básicos de la célula viva, sobre todo a nivel molecular. En otras palabras, si se lograba preservar la célula, se alargaba el tiempo de investigación sobre ella, lo cual permitió conocer desde sus características generales, hasta las moleculares.¹⁹

La inquietud por conservar cultivos, originó la necesidad de que dichos cultivos estuvieran puros, así como en Química o Bioquímica, se requieren de productos químicos "puros", también la Microbiología es dependiente de la pureza, viabilidad y estabilidad de cultivos microbianos. Sin embargo los productos químicos son almacenados fácilmente en anaqueles o estantes en condiciones que no alteran sus propiedades, en cambio, los cultivos de microorganismos son extremadamente vulnerables y pueden llegar a contaminarse fácilmente, sufrir cambios genéticos o llegar a morir. La necesidad de preservar microorganismos se aplicó de igual manera en universidades, para la enseñanza, estudios comparativos y de investigación, en hospitales, para estudios epidemiológicos o formación de colecciones de cultivos *stock* ó de referencia, en industrias, para procesos de fermentación o producción de antibióticos y enzimas, en laboratorios veterinarios o de agricultura, para la identificación de microorganismos patógenos y control de calidad de alimentos.^{19, 20}

Preservar significa conservar viable, puro y estable al cultivo microbiano, es decir, que las cepas conserven todas sus características morfológicas, fisiológicas y genéticas, aunque no hay que olvidar la predisposición de los microorganismos a variar. Muchos cultivos conservados durante un largo tiempo pueden crecer abundantemente, y no

obstante haber perdido muchas características biológicas que tenían antes de su preservación. Por lo tanto es importante reafirmar que la función básica de preservar un cultivo microbiano no estriba en mantenerlo vivo solamente, como ya se mencionó anteriormente en la definición.¹⁵

Frecuentemente los cultivos se pueden perder o contaminar, provocando problemas bastante graves; en ocasiones pueden ser reaislados o reemplazados mediante el servicio de colección de cultivos, pero en muchos otros casos no. De tal manera que la pérdida de un cultivo, ocasiona que tiempo, información y dinero se pierdan; ello se puede evitar si se emplea un sistema efectivo de preservación.^{20,19}

Actualmente existen organizaciones tales como la American Type Culture Collection (ATCC) fundada en 1904 y la National Collection of Type Cultures (NCTC) fundada en 1922. Además de estas instituciones existen otras: the National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB), the National Collection of Dairy Organisms (NCDO), National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF), the National Collection of Yeast Cultures (NCYC), por mencionar solo algunas, pues existen otras en Bélgica, Bulgaria, Checoslovaquia, Francia, Alemania, Hungría, Italia, Polonia, Portugal, Inglaterra, Japón, Turquía, etc..^{7,19,20}

Es notable que las instituciones antes mencionadas se pueden clasificar dependiendo del tipo de microorganismo que preservan y de la importancia veterinaria, industrial, marina, o médica que posean. Esta clasificación no solo facilita la búsqueda de una cepa en especial, sino permite tener una mejor organización y comunicación entre las instituciones existentes.¹⁹

En México existen colecciones microbianas desde el siglo pasado, cuando varios médicos mexicanos las trajeron del Instituto Pasteur de París. El propio Pasteur les enseñó las técnicas del cultivo y la elaboración de vacunas. Uno de estos investigadores fue el Dr. Angel Gaviño, primer director del Instituto Nacional de Higiene, Institución fundada en mayo de 1875, precisamente cuatro meses antes de la muerte de Luis Pasteur. Actualmente no existe una Institución Oficial en México, como las que se mencionaron anteriormente, pero sí se cuenta con diversos laboratorios o Ceparios, como se les ha denominado, en diferentes hospitales, y escuelas de Educación Media Superior, como el IPN y la UNAM, que poseen pequeñas y medianas colecciones de microorganismos.¹⁵

Las instituciones internacionales además de proporcionar el servicio de colección de cultivos, se encargan de tipificar y distribuir cepas a nivel mundial, proveer información sobre las cepas almacenadas o cursos de adiestramiento a personal sobre las técnicas de preservación que se practican en sus instalaciones, esto significa que una colección de cultivos implica no solo métodos de preservación sino, además una serie de funciones adicionales que ejercen un gran soporte en el campo de la Microbiología. Por otro lado, dado el gran avance en el campo de la computación, ahora se puede tener un contacto más cercano con dichas instituciones sin importar la distancia, ya que cuentan con correo electrónico y páginas en INTERNET que permiten realizar pedidos de cepas o simplemente consultar datos sobre las cepas que tienen almacenadas. Cabe señalar que los métodos sugeridos por la ATCC y otras organizaciones mundiales son buenos y llevan mucho tiempo de experiencia, aunque no siempre son ideales para todas las circunstancias y/o laboratorios.^{20, 19}

Es importante mencionar que en la Facultad de Química, perteneciente a la UNAM, se cuenta con un Cepario, que lleva a cabo las funciones antes citadas, además de realizar proyectos de investigación de métodos de preservación alternativos para su aplicación en determinados grupos de microorganismos, como es el caso de esta tesis.

1.2 Criterios para elegir el Método de preservación

En la actualidad existe una amplia gama de métodos de preservación que han sido probados con excelentes resultados y en los cuales la tendencia hacia la contaminación, pérdida de viabilidad o cambios genéticos son prevenidos.⁷

Sin embargo en muchos casos la elección del método a aplicar, no resulta ser tan fácil, por ello es indispensable conocer las ventajas y desventajas de cada uno de ellos, las necesidades de la colección y algunos otros factores como son:

1. Tipo de microorganismo.
2. Disponibilidad de mano de obra, equipo, especialistas, soporte financiero.
3. Importancia relativa de la viabilidad del cultivo.
4. Cambio de población microbiana por selección.
5. Cambios genéticos.
6. Costo.

7. Número de cultivos a preservar.
8. Valor de los cultivos.
9. Medio de transporte de cultivos
10. Frecuencia en la utilización de los cultivos.
11. Clima.

1. Tipo de microorganismo

Ciertas características que poseen los microorganismos permiten que sean más resistentes a procesos de secado, congelación o combinación de ellos. Tales características son: ser aerobios, gram-positivos, presentar forma cocoide, poseer cápsula, por citar algunas, los hace más resistentes que aquellos que no las poseen. Otras características como la capacidad para formar esporas o presentar mecanismos de reparación eficientes también les confiere cierto grado de resistencia a los cultivos que posean tales propiedades. Por ello es importante considerar los procesos involucrados en el método de preservación, a los cuales serán sometidos los cultivos y las características que éstos posean, para presumir si soportarán o no el proceso.^{20, 19}

2. Disponibilidad de mano de obra, equipo, etc.

En muchas ocasiones el método a aplicar requiere de equipo y personal especializado que hace que se incrementen los gastos denominados para él. Ante esto, en la elección del método se debe tomar en consideración, si se cuenta tanto con el equipo como con el personal capacitado para su aplicación y si dichas acciones no involucran gastos elevados. Por que en caso de no ser así, se necesitará de cursos de capacitación de personal o compra de equipo, por lo que ante todo, el método elegido debe involucrar la menor cantidad de dinero, con el máximo de ventajas, que es lo ideal, a menos que sí se cuente con los recursos financieros.^{20, 19}

3. Mantenimiento de viabilidad

Durante el proceso de preservación puede ocurrir muerte celular o puede perderse la viabilidad durante el tiempo que se almacene el cultivo. Para ello el método elegido debe minimizar la pérdida de viabilidad en los procesos de preservación y almacenaje.^{20, 19}

4. Cambio de población por selección

Una proporción de células de una población determinada puede llegar a morir durante el proceso inicial de preservación, ello puede carecer de significancia si se parte de una alta concentración celular. Sin embargo, la reducción en el número de células viables puede ser el resultado de un proceso de selección, esto es, el surgimiento de una población "nueva" resistente a las condiciones a las cuales fueron sometidos, con ello, se induce la posibilidad de cambios en sus características originales, ya sea, morfológicas o fisiológicas del cultivo preservado. Así, el método deberá de permitir el mayor número de células viables y de que éstas retengan sus características iniciales.^{20, 19}

5. Cambios genéticos

Usualmente diversos microorganismos son preservados, dada la importancia de sus características a nivel científico o industrial. Ante tal situación es de suma importancia que los cultivos preservados no pierdan sus características u obtengan otras, como resultado de cambios genéticos en su estructura molecular. Estos cambios pueden ocurrir durante el proceso de preservación, a través de mutaciones o pérdida de plásmidos (en algunos casos), o debido a la elevada vulnerabilidad de los microorganismos, a cambiar, dada su naturaleza promiscua de intercambio de material genético entre bacterias, que a la vez provoca que continuamente se realicen estudios taxonómicos para clasificarlos dentro de un grupo determinado de microorganismos y tipificarlos así, para propósitos epidemiológicos y clínicos. Por lo tanto el método a utilizar deberá evitar la ocurrencia de tales eventos^{20, 6, 25, 19}

6. Costo

El costo del mantenimiento de cultivos, involucra costo de personal, equipo, material, espacio para almacenaje y envío de muestras. Principalmente el elevado costo en el equipo empleado en ciertos métodos, como por ejemplo: la liofilización puede contrarrestarse con la reducción en el costo de personal, dada la estabilidad a largo plazo de los cultivos, lo que disminuye la frecuencia en la intervención manual por parte del personal. Esto significa, que para considerar el costo es necesario tomar en cuenta las ventajas y desventajas que ofrecen ciertos métodos.^{20, 19}

7. Número de cultivos

El principal factor a ser considerado, en lo referente al número de cultivos para la elección del método a emplear, es la relación entre el tiempo requerido para la preservación inicial y las subsecuentes manipulaciones. Por ejemplo, un método factible para la preservación de pequeñas colecciones, como lo es el repique, puede implicar una labor intensiva cuando el número de cultivos se incrementa, o por otro lado la elección de un método para una colección grande, como el congelamiento o liofilización, puede afectar el espacio disponible y contemplado para su almacenaje.^{20, 19}

8. Valor de los cultivos

Importantes cultivos pueden preservarse mediante métodos que prevengan el riesgo de pérdida total o parcial, si se toman en cuenta algunas características importantes de la cepa. En otros casos es recomendable el empleo de más de un método de preservación para tener una mayor seguridad. A su vez, las consecuencias resultantes de la pérdida de un cultivo y el costo que ello implica deben ser tomados muy en cuenta en la elección del método.^{20, 19}

9. Transportación de cultivos

Si los cultivos preservados son enviados y distribuidos, debe considerarse el medio de transporte y tipos de envíos (sobre, caja, ampollita, etc.), así como los costos que esto implica. Además es indispensable idear el empaque de la muestra y la cantidad de cultivos a distribuir. Si esto sucede a nivel internacional se tiene la obligación de mantener los registros y regulaciones necesarias en orden, para evitar problemas con autoridades aduanales.^{20, 19}

10. Frecuencia en el uso de cultivos

Algunos microorganismos, empleados en la industria, control de calidad o en laboratorios, requieren de un uso continuo de cultivos, por lo que el riesgo de contaminación de ellos debe considerarse. Además, si el uso de determinados cultivos es muy espaciado puede sugerirse un método de largo plazo y si son de uso continuo un método de corto plazo.^{20, 19}

11. Clima

A veces, a pesar de cumplirse con todos los puntos antes mencionados, el clima del laboratorio o del área en el que se trabaja, llega a afectar a los cultivos, principalmente cuando éstos se almacenan a temperatura ambiente; por ejemplo, en lugares húmedos, a largo plazo, posiblemente se hidratarán fácilmente los cultivos preservados por métodos de secado, o si el clima es extremadamente caluroso (arriba de 40°C) se propiciará la descomposición de ciertos medios de suspensión, si éstos no se refrigeran, o en caso de aplicar el método de repique, los cultivos se deshidratarán en períodos más pequeños y por tanto, se requerirá de transferencias mucho más continuas incrementándose así el trabajo y costo del método. ²⁸

Tomando en cuenta los puntos anteriores y realizando un balance entre las ventajas y desventajas (que más adelante se mencionarán) de cada uno de los métodos factibles a utilizar, se facilitará la elección del método más adecuado.

También es importante mencionar, que para aplicar cualquier método de preservación, se deben de cumplir ciertos requisitos en lo referente al cultivo a preservar:

- 1) el cultivo debe estar en buen estado (cultivo joven).
- 2) se deben respetar las condiciones óptimas de crecimiento: temperatura óptima, humedad, aireación, iluminación, medio de cultivo, etc.. ^{28,8}

Si se cumplen tales requisitos, se abarcará una parte de la efectividad del método a aplicar.

1.3 Factores que influyen en los procesos de preservación

1. Bajas temperaturas (Temperaturas de refrigeración)

A principios del siglo pasado se tenía la idea errónea de que las bajas temperaturas destruían los gérmenes, pero en realidad, ocurre todo lo contrario, es decir, los conserva. Su efecto sobre los microorganismos varía según la especie y el nivel de temperatura al cual se mantienen. ^{3,11}

Las temperaturas ordinarias de los refrigeradores (2 a 8°C) ejercen un efecto bacteriostático ya que el índice metabólico de las bacterias se reduce en gran medida,

de tal modo que no pueden reproducirse ni secretar productos en este estado; aunque en ciertas ocasiones después de realizar la siembra de un microorganismo en la superficie del agar o en un medio líquido (método de repique), la muestra se refrigera a 4°C y aún es metabólicamente activa y en su mayor parte las células mueren en pocos días o en algunas semanas. De esta manera algunos de los microorganismos más delicados, como, por ejemplo, el meningococo, no sobreviven durante mucho tiempo a la temperatura de refrigeración, de igual manera sucede con varios grupos de microorganismos, como *Streptococos*, *Neisserias*, etc., por citar algunos.^{3, 19}

2 Congelamiento

El congelamiento intenso en dos etapas utilizado en los laboratorios emplea un sistema en cascada de dos compresores en secuencia. Las temperaturas alcanzadas son del orden de -50 a -95°C, límites entre los cuales se puede preservar cultivos bacterianos. Un alto porcentaje de las células muere durante el ciclo de congelamiento, por ello para intentar una supervivencia óptima, debe regularse de una manera más precisa los índices de velocidad de congelación y descongelación y la naturaleza del medio de suspensión, porque los cristales de hielo que se forman durante la congelación pueden romper las membranas.^{3, 39, 1}

La congelación intensa en dos etapas, mencionada anteriormente, destruye muchas células no solo por la formación de cristales de hielo, sino también por la creación de condiciones osmóticas perjudiciales. La temperatura de congelamiento o temperatura a la cual se empiezan a formar los cristales de hielo puede ser disminuida por adición de ciertas sustancias a la suspensión celular, llamadas crioprotectoras. Cuando los cristales de hielo empiezan a desarrollarse, la energía calorífica, denominada calor latente de fusión, es liberada. Este fenómeno produce una elevación en la temperatura de la suspensión celular, que puede provocar ciertos daños en la estabilidad del microorganismo, pero principalmente el proceso de cristalización es el que ocasiona más daños a las células y del cual se han realizado más estudios. La cristalización de fluidos varía en el modelo, forma, tamaño y orientación de los cristales, dependiendo de la composición del medio, la velocidad y tipo de congelamiento. Este fenómeno es de vital importancia en el proceso de liofilización, por que los patrones cristalinos afectan significativamente la subsecuente velocidad de secado, así como la uniformidad, estabilidad y solubilidad del producto final. En general un lento congelamiento conduce a

una rápida sublimación, pero provoca bajos porcentajes de secado secundario, mientras que un rápido congelamiento da una sublimación lenta pero un secado secundario rápido.^{3, 36}

Las velocidades de congelamiento menores a 1°C/min son usualmente denominadas de congelamiento lento, y las velocidades por arriba de 100°C/min son denominados de congelamiento rápido, sin embargo, cabe señalar, que no existe una definición universal sobre el significado de congelamiento lento o rápido.^{36, 24}

Otro evento perjudicial para las células ocurre a la vez, en la suspensión acuosa de células, cuando los cristales de hielo empiezan a formarse (en el ambiente circundante de las células), dando como resultado un incremento en la concentración de solutos fuera de las células. Debido a la diferencia en la presión osmótica causado por el proceso anterior, el agua empieza a migrar fuera de las células para tratar de balancear la presión osmótica, pero también el hecho de que salga toda la cantidad de agua presente en las células causa daños. Por lo cual, debe considerarse tanto la formación de cristales como la concentración elevada de solutos en el proceso de congelamiento. De tal manera que si solo la concentración de solutos causa daño celular, una velocidad rápida de congelamiento puede ser lo ideal para evitar disminuir el tiempo en el cual las células están expuestas a una migración del agua fuera de ellas. Por el contrario el daño causado por los cristales de hielo puede ser controlado por un congelamiento lento. Sin embargo, lo ideal sería tener un equilibrio entre la velocidad y temperatura de congelación para evitar ambos factores de daño. Algunos investigadores reportan que con un congelamiento de 1 a 10°C por minuto se obtienen resultados satisfactorios en la viabilidad del microorganismo.^{12, 39}

En general, la formación de cristales y las condiciones osmóticas perjudiciales (alta concentración de electrólitos cuando el agua es removida) originadas por el congelamiento, remueven el agua de proteínas y del DNA de las células, por lo que el efecto sobre las células es letal.^{24, 20}

El efecto microbiostático del congelamiento se parece en algunos aspectos a los ocurridos en la desecación, ya que, en ambos el agua no esta disponible para los propósitos fisiológicos celulares, debido a que en el congelamiento se inmoviliza y en la desecación se remueve y elimina.^{12, 24}

3. Congelamiento lento

Cuando los microorganismos son congelados mediante este proceso, se tienen diversos puntos críticos, ya que conforme se va congelando se va separando cierta cantidad de agua de las células y los microorganismos son expuestos a un incremento en la concentración de los solutos y ello puede provocar un shock hipertónico. A través del congelamiento lento se permite la formación extracelular de cristales de hielo y la deshidratación intracelular mediante ósmosis, además los cristales intracelulares que se forman son mínimos, sin embargo, son de gran tamaño por lo que dañan en mayor grado la integridad membranal de las células.^{37, 36}

Otras investigaciones demostraron que un lento congelamiento (de 20 a 30 minutos) es un método preferible si las células son suspendidas en una solución del 5 al 50 % de glicerol, dicha solución permite retirar el agua de las células, para evitar la cristalización y además actúa como anticongelante dentro de la célula o permite que se den ajustes osmóticos entre el interior de la célula y el fluido.³⁹

4. Congelamiento rápido

Estudios realizados en diversos cultivos de microorganismos sometidos ha congelamientos rápidos, han demostrado que existe un elevado porcentaje de reducción en la viabilidad de cultivos anaerobios, el cual aumenta conforme se incrementa la velocidad de congelamiento, en comparación con los cultivos aerobios. Por otro lado, observaciones hechas en microscopio electrónico permitieron observar que en un rápido congelamiento de cultivos aerobios, sólo unas cuantas células mostraban cristales intracelulares, mientras que en cultivos anaerobios ocurría lo contrario, ya que la mayoría de las células presentaban un congelamiento intracelular. De esta manera, tales resultados indican que los cultivos anaerobios, los cuales presentan una baja permeabilidad en su membrana celular hacia las moléculas de agua, son más sensibles a un rápido congelamiento, no así los cultivos aerobios que son tolerables a las bajas temperaturas de congelamiento, ciertamente por la alta permeabilidad de su membrana celular para las moléculas de agua. Además, de la naturaleza del microorganismo a preservar, ya sea aerobio o anaerobio, es primordial considerar la composición del medio como un factor potencial en el daño provocado por el congelamiento, es decir, es necesario que en el medio de suspensión se cuente con agentes crioprotectores.^{37, 36, 24}

Una causa de la muerte de las células al congelarse es debido a la formación de cristales de hielo intracelulares como ya se mencionó anteriormente, con el consecuente mecanismo destructivo celular, por lo cual, mediante este método (congelamiento rápido, de 1 a 10 segundos) se tiende a prevenir la cristalización intracelular excesiva, debido al proceso de vitrificación, esto es, la solidificación del agua en forma no cristalina (amorfa, o formación de sólidos, sin cristalizar). El proceso de vitrificación antes descrito, es fomentado a su vez, por el empleo de sustancias crioprotectoras, mediante la compresión de la zona crítica de temperatura.^{36, 12}

Por lo citado anteriormente se han realizado diversos estudios, probando diferentes temperaturas y tiempos de congelamiento, lo que permitió concluir que entre más rápido sea el congelamiento, los cristales de hielo intracelulares que llegaran a formarse son demasiado pequeños, lo que permite disminuir el daño estructural de las células.³⁹

5. Cristalización intra y extra celular

En general la formación de cristales de hielo intracelulares son considerados de mayor efecto dañino a las células, comparado con la formación de cristales extracelulares, debido a que los primeros afectan más profundamente la estructura celular. Por ello el congelamiento extracelular se prefiere y se ha encontrado que, volúmenes celulares pequeños y una elevada permeabilidad de la membrana celular de los organismos provoca un congelamiento extracelular.^{36, 39}

6. Sistemas de congelación

Para el método de liofilización, los sistemas de congelación deben ser concebidos en tal forma que ofrezcan la posibilidad de tratar los productos más diversos en función del tiempo de congelación deseado y también deben tener en cuenta las múltiples formas en que los productos van a ser condicionados para la liofilización, productos a granel, en ampollitas o en frascos, cantidad de producto por recipiente, o si la congelación va a ser en placa o en capa.^{24, 37}

Algunos instrumentos permiten congelar en capa y obtener así una capa del producto de espesor uniforme (condición sin la cual no hay una buena liofilización). Los métodos de congelación más comúnmente empleados en el proceso de liofilización son: mezclas de hielo y sal, hielo seco, congeladores, o en algunas plantas comerciales se

cuentan con recipientes metálicos a los cuales se les recircula por sus paredes alcohol o salmuera por medio de un refrigerante mecánico.^{24,28}

En el caso de los métodos de congelación, generalmente se emplean congeladores Revco u otros que posean reguladores y alarmas de temperatura que permitan tener un control confiable de la temperatura de congelación.^{39,36}

7 Deseccación

El uso de la desecación con vacío y con o sin congelamiento previo, empleado para la preservación de microorganismos es uno de los principales productores de la condición denominada microbiostasis, ya que en la desecación el agua no esta disponible para que los microorganismos lleven a cabo sus funciones fisiológicas, por lo que su metabolismo se detiene en gran medida pero no completamente, pues estudios realizados han demostrado que los microorganismos en estado de completa desecación y con vacío, suelen presentar aún actividad metabólica en un bajo porcentaje. Aunque cabe señalar que el proceso metabólico puede pararse casi completamente, si se regulan los mecanismos de ósmosis, difusión, ionización, y estado coloidal que presenten las células, y a su vez, se controla el estado de hidratación en el que se encuentran.¹²

Un secado excesivo de los microorganismos, ocasiona reacciones de oxidación de lípidos y proteínas, aunque cabe mencionar que dichos procesos no están perfectamente estudiados. Sin embargo, algunos investigadores reportan que dichos daños se evitan con la presencia de ciertos porcentajes de agua, no estandarizados. Otros efectos dañinos causados por un secado excesivo, son los ocasionados por la generación de radicales libres, o radicales aminocarboxilos, producto de un metabolismo desequilibrado.³⁹

En lo referente a las características presentes en los microorganismos, que les confieren cierta resistencia a la desecación, encontramos que los microorganismos capsulados o esporulados son más resistentes en comparación con los que no lo son.²⁴

8 Presión osmótica

Si las células viables son inmersas en fluidos con una alta presión osmótica el agua puede salir de las células y éstas sufren colapsos (plasmólisis), por el contrario, si

las células son inmersas en un fluido a baja presión osmótica el agua penetrará en la célula provocando su ruptura (plasmólisis).^{39, 12}

Soluciones extremadamente hipertónicas, como la salmuera, o ciertas concentraciones de carbohidratos tienen un valor preservativo, pues ellas retiran el agua de las células, lo cual ocasiona un efecto microbiostático en muchos microorganismos. La acción de soluciones hipertónicas es comparable con la desecación, la cual remueve el agua enteramente y con el congelamiento al inmovilizar el agua en la célula. La alta concentración de solutos y la baja temperatura de congelamiento, resultan en áreas de material no congelado.^{12, 36}

9. Autólisis

En la preservación de microorganismos por congelamiento, desecación o métodos similares, es posible que se presente el fenómeno de autólisis, mecanismo de autodigestión celular producido por enzimas intracelulares, las cuales son liberadas cuando las células mueren o llegan a ser completamente inertes.¹²

10. Liberación de radicales libres

Los radicales libres son producto del proceso de muerte celular, es decir, al morir las células, el O₂ reacciona con una serie de constituyentes celulares, lo que ocasiona la liberación de radicales libres al medio, por lo que si esto sucede durante el proceso de almacenaje de los microorganismos preservados, o durante su rehidratación o reactivación, se provoca un mecanismo letal.^{12, 39}

En el estado seco, los radicales libres se estabilizan, aunque si el proceso no se realizó adecuadamente, sucede lo contrario, comienzan a acumularse hasta dañar totalmente al microorganismo.³⁶

11 Tamaño y tipo de células.

Las células de tamaño grande como las de protozoarios son más difíciles de congelar, probablemente por que contienen mayor cantidad de agua intracelular y por ello son más susceptibles a sufrir daño celular. Sin embargo estos organismos presentan un sistema más eficiente de reparación de daños celulares. Mientras que los virus son menos propensos a sufrir daños durante la congelación, pero si acaso sufrieran alguno no cuentan con los mecanismos necesarios para su reparación. El Gram de las bacterias

también influye, ya que las bacterias Gram-positivas son más fáciles de liofilizar, es decir, son más resistentes a los procesos de desecación y congelamiento, dado que poseen una pared celular relativamente gruesa, con un mayor contenido de peptidoglucano (20 a 80%) en comparación con las bacterias Gram-negativas y con numerosos enlaces transversales entre las cadenas de N-acetil-murámico y N-acetil-glucosamina.^{36, 24}

12. Edad del cultivo

Ha sido demostrado que la edad del cultivo es un factor importante, ya que se ha visto que los cultivos que se encuentran al final de la fase logarítmica y al principio de la fase estacionaria sobreviven en un mayor porcentaje que los cultivos preservados en la fase activa de crecimiento (fase logarítmica) (Fisher, 1963; Annear, 1954). Sin embargo, el estado más favorable de crecimiento varía de especie a especie, además de depender de las condiciones del proceso de preservación, aunque generalmente se ha observado que cultivos jóvenes o viejos son menos resistentes a las bajas temperaturas.^{24, 36}

13. Concentración celular

En el método de liofilización, cuando se parte de una elevada concentración celular, se previenen ciertos efectos dañinos por los cristales de hielo durante el proceso de sublimación, ya que se forma una gruesa red intersticial, que impide la desorción de moléculas de agua no congeladas, las cuales son universalmente distribuidas cohesivamente en el material celular. Además dificulta la dispersión de las células a lo largo de el contenedor (ampolletas, viales, etc.), lo cual es esencial para tener una larga y uniforme superficie del espécimen, y así, obtener un eficiente secado. En contraste cuando la concentración celular es baja, a falta de la red intersticial, que mantiene unidas a las células, se produce una dispersión del material en dirección del flujo del vapor de agua durante la sublimación, esto provoca que una cantidad incontable de células se pierdan. Cuando no se puede obtener una concentración satisfactoria del espécimen y solo se cuenta con pequeñas concentraciones celulares, la utilización de moléculas de unión se pueden emplear.^{39, 36}

14. Medio de cultivo

Para el caso del método de repique, es preferible el empleo de medios mínimos, por que permiten la disminución del metabolismo del microorganismo y por lo tanto

prolongan el período entre las transferencias. Algunas bacterias en tanto, requieren de medios complejos para su crecimiento o necesitan de ciertos compuestos para conservar determinadas características fisiológicas, de tal manera que cuando un medio complejo se utiliza, transferencias más frecuentes pueden ser necesarias, debido a un crecimiento acelerado o a una acumulación de productos metabólicos finales, como es el caso de medios que contienen un exceso de carbohidratos y la producción de ácido resultante mata al cultivo. ^{8, 28}

15. Porcentaje de humedad residual

Un elevado porcentaje de humedad residual en el producto final, en el caso de liofilizados y productos sometidos a secado, producen efectos dañinos durante el período de almacenaje, pero también una disminución en el porcentaje provoca serios deterioros de la estructura de los materiales celulares acompañado además por la pérdida de toda actividad y finalmente lleva a la reducción de la viabilidad celular. Ante tal situación se han empleado métodos como el de Karl-Fisher, curvas de peso, resonancia magnética nuclear y otras, para determinar el adecuado porcentaje de humedad residual en productos secos y liofilizados. ³⁹

16. Almacenaje

Durante los períodos de almacenaje, los microorganismos preservados pueden sufrir ciertos daños, como consecuencia del contacto con humedad, oxígeno, radiaciones, etc.. Por ello, los microorganismos liofilizados son usualmente sellados bajo condiciones de vacío u otro gas inerte, como nitrógeno o argón, y también se recomienda que sean almacenados en ausencia de luz. ^{39, 24, 19}

Para el caso especial del método de repique, la manera más sencilla de almacenaje es el empleo de tubos de ensayo almacenados a temperatura ambiente, o en cajas especiales. Los cultivos así guardados, requieren cuidados constantes, ya que tienden a secarse (deshidratarse) rápidamente, debido a que están sujetos a fluctuaciones de temperatura, a no ser que el laboratorio cuente con un control ambiental. Para minimizar el proceso de deshidratación del medio sólido, se puede emplear tapones de rosca para los tubos, cubrir el cultivo con aceite mineral o colocar los tubos en bolsas de plástico especiales. ⁶

17 Rehidratación

Dada la alta facilidad de hidratación de los productos liofilizados, muchas veces el paso de reactivación o rehidratación no es tomado en cuenta, sin embargo, en ciertas ocasiones influye en la pérdida de viabilidad del microorganismo, a pesar de que este ha sido preservado satisfactoriamente. Esto es, el empleo de soluciones hipertónicas y su rango de pH, para la rehidratación, así como la temperatura del diluyente, causan daños al microorganismo.³⁶

En general los productos secos son rehidratados mediante adición de agua destilada o caldo, a temperatura ambiente. Sin embargo, una rápida reabsorción de las moléculas del agua, ocasiona una expansión abrupta de los productos secos y la ruptura en la estructura de su membrana celular puede ocurrir. Al mismo tiempo una rápida reactivación ocasiona un desequilibrio entre los componentes de la membrana celular. Otros estudios han demostrado que tanto la rápida como la lenta rehidratación ocasionan daño (degradación a nivel de fosfolípidos en levaduras). También se han reportado diversos porcentajes de viabilidad cuando se hidrata a ciertos rangos de temperatura. Ante ello, es importante señalar que no se ha logrado estandarizar estos parámetros, de tal manera que se pueda decir cuales son las condiciones ideales de rehidratación, lo aconsejable es que cada laboratorio lo estandarice de acuerdo a sus necesidades.³⁹

1.4 Agentes crioprotectores

Las sustancias crioprotectoras, se pueden definir, como aquellas sustancias compuestas por moléculas grandes o pequeñas, que son dispersadas en una suspensión para proteger a las células de daños ocasionados por congelamiento o secado.^{39, 8}

Generalmente las sustancias crioprotectoras empleadas en la congelación y liofilización, actúan como anticongelantes, disminuyendo así, el punto de congelamiento, a la vez que se reduce el tiempo durante el cual las células están expuestas a la temperatura crítica, algunos otros penetran rápidamente a la célula, reduciendo la posibilidad de formación de cristales de hielo, y reemplazan el agua eliminada, para que el microorganismo soporte las condiciones de desecación. Los crioprotectores pueden ser empleados tanto en el lento como en el rápido congelamiento.^{25, 18}

Un buen agente crioprotector debe presentar las siguientes características en forma de medio de suspensión:

- 1) No ser tóxico.
- 2) No requerir condiciones especiales de congelamiento o liofilización.
- 3) No debe haber formación de grumos en el medio de suspensión durante la liofilización.
- 4) El liofilizado o fluido de suspensión almacenado debe rehidratarse fácilmente en agua fría.
- 5) El medio de suspensión debe proteger al organismo durante el congelamiento o el secado.
- 6) El medio de suspensión debe de estabilizar al organismo contra los efectos adversos del almacenaje.
- 7) Los diversos componentes del medio de suspensión no deben provocar daños a las propiedades del microorganismo.
- 8) Cuando se empleen azúcares, éstos no deben estar en concentraciones muy altas pues disminuyen el punto de congelamiento a valores bajos imprácticos. Esto causa un colapso en la estructura por que la solución no se congela completamente (cristalización) o por que la temperatura de manutención se torna muy baja. No debe formar una capa impermeable al vapor.
- 9) Penetrar fácilmente la membrana celular (en algunos casos).
- 10) Unión a cualquier electrólito que incremente la concentración del medio, durante el congelamiento.^{8, 36}

Clasificación y mecanismos de crioprotección

Existen dos clasificaciones de agentes crioprotectores:

1. en base al peso molecular y,
- 2 en base a la constitución bioquímica.

La clasificación número 1 fue la primera que se utilizó en los inicios de los métodos de preservación, en ella se clasifica a los agentes crioprotectores en dos grandes grupos: los de *bajo peso molecular* como, aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, etc. y; los de *elevado peso molecular* como, proteínas, polivinilpirrolidona,

polímeros sintéticos, polícarbohidratos, etc.. Esta clasificación provocó que en un inicio los de bajo peso molecular fueran empleados solo para la liofilización, puesto que presentaban fuertes grupos de unión al hidrógeno, -OH, -NH₂, -NH, =O, o por sus grupos ácidos o básicos. Además se consideró así, ya que las propiedades fisicoquímicas, y los mecanismos de protección de las sustancias de elevado peso molecular no habían sido clarificadas. Actualmente se sabe que su acción radica en proteger la superficie celular, debido a la regulación de la presión osmótica, favoreciendo el desplazamiento de solutos y evitando la concentración de éstos en el interior de la célula. ^{39, 36}

Cabe señalar que se han realizado estudios que permiten demostrar que lo ideal es emplear tanto sustancias de elevado y bajo peso molecular, esto es, combinaciones de ellas, que permitan un mayor efecto protector en las células. De tal manera que usando estas combinaciones se ha comprobado que dichas sustancias retienen la cantidad ideal de agua para la supervivencia del microorganismo, a nivel de la membrana celular, controlando su permeabilidad. ³⁹

La segunda clasificación es la que actualmente se utiliza, ésta clasifica a los agentes crioprotectores en tres grupos: proteínas, azúcares o carbohidratos y aminoácidos, cuyo mecanismo de protección se menciona a continuación.

Proteínas: proveen una capa protectora para los microorganismos, sirve como un bolo formado de coloides que dan rigidez al microorganismo a preservar.

Azúcares: pueden prevenir el daño provocado por la deshidratación, mediante la sustitución de agua evitando así una deshidratación excesiva. Proveen una capa protectora a nivel molecular.

Aminoácidos: protegen a los microorganismos de procesos de desnaturalización provocados por los grupos carboxilo, mediante la captura de éstos. ^{8, 18}

Sustancias con propiedades crioprotectoras

Materiales proteicos

Suero integral de varias especies de animales.

Albúmina de pollo.

Fluido alantóico.

Gelatina.

Peptona.

Carbohidratos o polímeros de carbohidratos

Amino soluble.

Arabinosa.

Glucosa.

Dextrana.

Glicogeno.

Inositol.

Lactobionato de calcio.

Lactosa.

Rafinosa.

Sacarosa.

Sorbitol.

Aminoácidos

Arginina.

Glicina.

Glutamato de sodio.

Leche descremada.

Glicerol.

Dimetil sulfóxido (DMSO).

Cationes: Mg y Ca.

Agentes quelantes: EDTA, EGTA.

Sales (orgánicas e inorgánicas)

Cloruro de sodio.

Cloruro de potasio.

Citrato de sodio.

Cloruro de amonio.

Acetato de amonio.

Mono y di-fosfato de potasio. ^{8, 37, 39, 36, 29, 12}

No se cuenta con suficiente información sobre el mecanismo exacto de protección de cada uno de los agentes crioprotectores mencionados anteriormente, pero sí sobre algunos, esta información se da a continuación:

Glicerol y DMSO: pueden atravesar la membrana celular congelada. Estas sustancias presentan como característica una fuerte unión hacia el hidrógeno y ejercen su actividad modificando la forma del cristal de hielo. ^{39, 8, 29}

Lactosa, sacarosa, etc.: al igual que los anteriores presentan un fuerte grado de unión hacia el hidrógeno, además son permeables a las membranas celulares, aunque en menor grado que los anteriores. ^{39, 8}

Mg: la protección debida a los iones magnesio, consiste en una acción inhibitoria de la ribonucleasa, ya que, la alteración en el ARN, especialmente en los ribosomas, es el proceso inicial que determina la pérdida de viabilidad. ³⁴

Na-glutamato: proporciona un efecto protector contra el daño ocasionado por la presencia de sales alcalinas (éstas ejercen un efecto letal en las células durante el proceso de congelamiento). ³⁷

Es importante mencionar, que en algunas ocasiones es necesario tomar en cuenta precauciones adicionales, por que el agente crioprotector con el que se trabaja, presenta ciertas características nocivas para el personal que lo manipula o que tales características les impiden ser usados en determinados procesos. Dentro de dichas precauciones encontramos:

Para el caso del glicerol y otros alcoholes, conocidos como buenos agentes crioprotectores en el congelamiento, no deben ser usados en la liofilización, dado que presentan la propiedad de ser higroscópicos. ³⁹

A pesar de que el dimetilsulfóxido es considerado un buen crioprotector, es necesario considerar que es potencialmente tóxico para la piel, y rápidamente se absorbe. ²⁸

Como ya se mencionó anteriormente al combinar agentes crioprotectores de diferente naturaleza, ha permitido preservar microorganismos con excelentes resultados,

por lo que en seguida se hace mención de algunas combinaciones, que ya han sido probadas.

Medios de suspensión

Generalmente suero glucosado 7.5%, leche descremada 10%, leche descremada 10% e inositol 5%, sacarosa 7% y peptona 7%, inositol 5% y suero de caballo, inositol 6% y caldo nutritivo han sido usados en la liofilización de bacterias. Leche descremada y mezclas de ésta con inositol también han sido usadas en la liofilización y para congelación se ha empleado glucosa al 7.5% y suero de sangre de caballo ^{8,5,7}

El uso de glucosa en la liofilización como medio de suspensión, demostró, mediante estudios hechos por Lechinska y Fry (1946), y Graves (1951), que concentraciones con 7.5% de glucosa daban resultados favorables, pero concentraciones por arriba de este porcentaje dificultaban el proceso de deshidratación. Ello llevó a la investigación de la causa de tal suceso, y se encontró que la glucosa al igual que otros carbohidratos retienen automáticamente cerca del 1% del contenido total de agua. Por lo tanto, la elevada concentración de carbohidratos y otros constituyentes orgánicos en los medios de suspensión empleados, ocasionan ciertos deterioros en organismos autotrófos, ya que retienen un mayor porcentaje de humedad. ²⁴

El uso de suero equino o bovino con acción protectora coloidal, resultaron mejores agentes crioprotectores que la gelatina o las dextranas, en el método de liofilización, debido a que impiden la aerosolización de bacterias en dirección con el flujo de vapor de agua durante la liofilización; y permiten una mayor rapidez en el proceso de rehidratación. ²⁴

1.5 Métodos de preservación

En los diversos métodos de preservación, a pesar de las diferencias existentes entre cada uno de ellos, ya sea en cuanto a procedimiento, material, o equipo empleado para su realización, todos tienen en común, la disminución de la actividad metabólica de los microorganismos, para así conservarlos por períodos cortos o prolongados, en el mejor de los casos. De esta manera, de acuerdo al tiempo de conservación, se pueden clasificar en tres grupos: ⁸

1. De **corto plazo** (duración de 1 año o menos): repique, resiembra periódica con aceite mineral, y bloques de agar en agua.
2. De **mediano plazo** (duración de 1 a 6 años): secado en sílica gel, suelo estéril, discos de gelatina, discos de porcelana y tiras de papel.
3. De **largo plazo** (duración de 6 años o más): liofilización, congelamiento y ultracongelación almacenamiento en nitrógeno líquido.

1.5.1 Métodos de preservación de corto plazo.

Subcultivo, resiembra periódica, o repique: es el método más tradicional de preservación, que consiste en efectuar resiembras periódicas de los cultivos en medios mínimos, como agar nutritivo u otro medio que no contenga inhibidores, o sustancias bactericidas o bacteriostáticas que puedan matar a la bacteria durante el almacenamiento. Dichas resiembras se realizan a intervalos regulares que pueden variar de un día a varias semanas o meses, según el tipo de microorganismo, medio de cultivo empleado y las condiciones ambientales que se presenten. Para la gran mayoría de las bacterias y hongos pueden usarse medios como agar nutritivo, caldo casoy y agar extracto de levadura, agar extracto de malta, agar Sabouraud, agar almidón, y caldo peptona, respectivamente.^{3, 5, 8}

Para obtener buenos resultados al emplear este método se deben tomar en cuenta los siguientes puntos:

1. Minimizar el número de repiques para evitar la selección de mutantes
2. Conservar por duplicado los cultivos como precaución contra posibles pérdidas.
3. Examinar la pureza del cultivo en cada transferencia, efectuando una sencilla rutina que corrobore sus propiedades, y permita detectar cualquier cambio en sus características fenotípicas.
4. No seleccionar diferentes colonias, puesto que éstas pueden ser mutantes, siempre escoger varias colonias que presenten las mismas características entre una y otra transferencia.^{28, 8}

Muchas bacterias como los estafilococos y coliformes sobreviven por diversos meses con este método, mientras que otros más delicados como *Neisseria spp.* requieren de subcultivos a intervalos menores (semanas).²⁰

Ventajas

- ⇒ La transferencia y la pureza se pueden verificar fácilmente.
- ⇒ Existe una pronta disponibilidad de los cultivos.
- ⇒ Duran períodos largos de tiempo si se almacenan en la obscuridad y sellados.
- ⇒ Bajo costo. No es caro en términos de equipo, ya que no requiere equipo especializado, pero sí implica una labor intensiva si los microorganismo necesitan de frecuentes subcultivos para su conservación.
- ⇒ El método es aplicado a una amplia gama de microorganismos.^{15, 8, 28}

Desventajas

- ⇒ Se contaminan fácilmente (se puede evitar empleando una adecuada técnica bacteriológica de siembra y la pre-incubación de los medios de cultivo a utilizarse) y se secan si no están sellados.
- ⇒ Pueden suceder pérdidas de cultivo por accidentes de laboratorio.
- ⇒ Riesgo de error al etiquetar los tubos, ello se incrementa cuando quien lo realiza está fatigado y se altera su concentración. Por lo cual es sugerible el empleo de etiquetas impresas para evitar alteraciones que lleven a interpretaciones erróneas.
- ⇒ Los cultivos preservados por este método están muy propensos a la pérdida de estabilidad de caracteres y el riesgo de mutaciones aumenta conforme aumenta la frecuencia de los subcultivos.
- ⇒ Espacio relativamente grande requerido para el almacenaje de los cultivos.^{15, 3, 20}

Resiembra periódica con aceite mineral o transferencia periódica espaciada: muchas especies de hongos pueden ser preservados por varias semanas o meses mediante un método relativamente fácil, como lo es la inmersión en aceite mineral, o parafina con una densidad de 0.830 a 0.890. La técnica es similar a la del método anterior, sólo que aquí se adiciona aceite mineral a la resiembra, es decir, una vez que se obtiene un crecimiento satisfactorio del microorganismo en un medio sólido inclinado en tubos, se adiciona asépticamente el aceite mineral estéril al tubo hasta una altura aproximada de 1-2 cm. (dejar de adicionar el aceite hasta que cubra completamente la

superficie), esto impide la deshidratación, reduce la actividad metabólica, así como la velocidad de crecimiento del microorganismo, debido a una reducción en la tensión de oxígeno. Posteriormente se guardan los cultivos en posición vertical y en refrigeración entre 0-3°C. También es recomendable almacenarlos en la obscuridad.^{8, 15}

Cabe mencionar que en ciertas ocasiones la contaminación de cultivos al emplear este método es debido a que la esterilización del aceite mineral se llevo a cabo incorrectamente. Por eso es importante que éste se esterilice en horno a 170°C de 1 a 2 horas o en autoclave por 15 min. a 121°C.^{8, 28}

Algunas otras recomendaciones son: evaluar periódicamente los cultivos para la detección temprana de contaminaciones; cuidar de no salpicar el aceite al flamear el asa bacteriológica o micológica, después de la transferencia del cultivo, pues ello contamina el área de trabajo; y guardar el cultivo original por algunas semanas, ya que puede suceder que se contamine el subcultivo o muestre características anormales, por lo que nuevamente se puede tomar inóculo del cultivo original.^{19, 24}

El método es recomendable para conservar gonococos y ficomicetos acuáticos (que no se pueden liofilizar) o para basidiomicetos con micelio vegetativo y otros grupos de hongos.¹⁵

Ventajas

- ⇒ Larga viabilidad.
- ⇒ Bajo costo
- ⇒ No requiere equipo especial.
- ⇒ Prevención de ácaros.
- ⇒ Supervivencia de especies sensibles a los demás métodos.²⁸

Desventajas

- ⇒ Riesgos de contaminación.
- ⇒ Los organismos suspendidos en aceite mineral son de difícil manejo
- ⇒ Reactivación demorada.
- ⇒ Crecimiento prolongado en condiciones adversas (posible proceso de selección y con ello variaciones fenotípicas o genotípicas, etc.).
- ⇒ Accidentes de trabajo.^{15, 8, 28}

Bloques de agar en agua: este método consiste en cultivar el microorganismo en una placa de agar. Después del tiempo de incubación para la obtención de un crecimiento satisfactorio se corta el agar con una laminilla estéril en bloques de aproximadamente 4-6 mm.⁸

Generalmente se utilizan tubos con un contenido de 10 a 15 ml de agua destilada estéril y a éstos se les adicionan los bloques de agar, cuidando de no sobrecargar el agua con los bloques, ya que de esta manera no se reduce la disponibilidad de nutrientes y consecuentemente no hay reducción del metabolismo celular. Para reactivar el microorganismo basta con retirar uno o dos bloques de agar y depositarlos en un medio de cultivo adecuado.²⁸

Este método es muy recomendable para microorganismos que presentan un alto grado de adherencia al agar como sucede con los hongos filamentosos y algunas levaduras.^{8, 28}

Ventajas

- ⇒ Buena viabilidad
- ⇒ Sobrevivencia de especies sensibles a otros métodos de preservación.
- ⇒ Bajo costo en equipo y mano de obra.
- ⇒ Baja infestación por ácaros.⁸

Desventajas

- ⇒ Dificultad de retirar una muestra (cubo de agar).
- ⇒ Alto riesgo de contaminación.²⁸

1.5.2 Métodos de preservación de mediano plazo.

Secado, desecación o deshidratación: existe una amplia variedad de métodos, todos consistentes en la remoción de agua y prevención de la rehidratación. El principio de éstos métodos consiste en que dado que la actividad metabólica requiere agua, mediante la deshidratación se reduce dicha actividad, permitiéndose la prevención de cambios en los cultivos microbianos. El método es altamente eficiente y ha sido usado por más de 70 años, como lo indica la siguiente recopilación de experimentos.^{19, 15, 35}

Bagga en 1967 desecó 26 cultivos de microorganismos a 0, 10, 20,30 y 40°C empleando a la vez CaCl_2 como desecante, por 24 horas. Después del secado se almacenaron en refrigeradores. Los resultados que se obtuvieron fueron. los cultivos secados a 0, 10 y 20°C presentaban una viabilidad superior a la de los secados a 30 y 40°C, además de que una humedad relativa de 0 a 5% fue la adecuada para mantener dicha viabilidad. Los resultados a 30 y 40°C se explican, ya que a tales temperaturas las proteínas u otro material que forma parte de las células secas, se desnaturalizaron, o a la presencia de reacciones de oxidación generadas, cuando la temperatura de secado aumenta, lo cual provocó su muerte.³²

Después Grivell y Jackson, en 1969, reportaron la supervivencia de diversas bacterias por varios años, sin cambios en sus características originales, pero sí en ciertas levaduras.²⁰

Posteriormente Kitasato en 1889 observó que microorganismos, como, *Vibrio cholerae* sobrevivió bien por largos períodos, en estado de desecación, mediante vacío. Así Miller y Simons en 1962 secaron 202 cultivos, representativos de 67 especies de microorganismos, empleando CaCl_2 como desecante y un sistema de vacío. Después de un período de 10 años, se encontraron que solamente 13 cultivos no crecieron, además de notar que las bacterias gram-positivas sobrevivieron mejor que las gram- negativas³²

En general, para la realización de este método, se colocan elevadas concentraciones de la muestra en discos de cera u otro material adecuado como arena o sílica gel, por mencionar algunos y luego se pasan a un desecador, para eliminar la humedad, en algunos casos se emplean tanto desecadores como bombas de vacío. Después del secado se pueden almacenar los discos en recipientes estériles, que contengan indicadores de humedad o sustancias desecantes.³

A la vez, de acuerdo a la serie de experimentos que se han realizado empleando el secado, se ha determinado que:

- 1) La rápida desecación con vacío o con algún agente desecante o combinación de ambos, es preferible a una desecación lenta o a temperatura ambiente,
- 2) la presencia de agentes protectores como proteínas (leche) o carbohidratos (trehalosa), aumentan el porcentaje de supervivencia de los microorganismos cuando estos son sometidos a un proceso de secado, y,

- 3) los cultivos secados y almacenados en refrigeración sobreviven por períodos más largos, que los almacenados a temperatura ambiente, aunque para ello se requiere de viales con sellado especial, para evitar la entrada de humedad presente en el refrigerador.

El secado ha sido ampliamente usado en el reino fungi principalmente, los cuales parecen ser más resistentes que otros grupos de microorganismos al secado. Algunas levaduras y determinadas bacterias pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* y *Enterobacteriaceae* han sido también preservadas satisfactoriamente mediante este método.⁹

En la actualidad existen diversos tipos de secado, cuya diferencia radica en el medio de soporte a utilizar, así encontramos secado en: arena, tierra, sílica gel, discos o tiras de papel, discos de gelatina, chaquiras, etc.¹⁹

Secado en sílica gel: es considerado un buen método de preservación y su principio es el mismo que el de secado, con la diferencia de que se emplea sílica gel como soporte principal. Ha sido aplicado principalmente a hongos esporulados, obteniéndose excelentes resultados, debido a la gran adherencia de las esporas hacia la superficie de la sílica gel. Puede realizarse de una manera simple con un desecador o empleando vacío.²⁰

La técnica empleada consiste en realizar una suspensión de esporas en un medio de leche descremada al 10% (se deposita una alícuota de la leche sobre la superficie del agar inclinado y se frota ligeramente con un asa bacteriológica o simplemente se agita el tubo suavemente), a continuación se deja caer la suspensión fría sobre la sílica gel (contenida en el vial), depositando el vial en un baño con hielo, por lo menos durante 15 min., posteriormente se deja secar a temperatura ambiente o en desecador, procurando remover los cristales formados con la ayuda de una espátula estéril, durante 1 o 2 semanas (esto permite una homogeneización de las esporas presentes con la sílica, además de remover parte del agua que todavía no se ha eliminado), este tiempo puede reducirse dependiendo del microorganismo, como sucede con *Fusarium sp* hongo de crecimiento rápido que requiere solamente de 4 a 5 días.^{5,8}

Se recomienda almacenar los viales en un atmósfera fría aunque también se obtienen buenos resultados si se dejan a temperatura ambiente.⁵

Este método fue realizado inicialmente por Perkins en 1962. Posteriormente en 1975 Trollope evaluó 33 cultivos bacterianos y 22 de hongos, preservados con este método, y a los cuatro años evaluó su viabilidad, comparando los que había almacenado a temperatura ambiente con los que había mantenido en refrigeración, encontrando un 64% en bacterias y un 77% en hongos, mientras que en los almacenados en refrigeración a 4°C registró un mayor porcentaje en ambos tipos de cultivos. Cabe mencionar que este proceso también es aplicable a bacteriófagos, como lo reportó Iijima y Sakane en 1973.³⁵

Actualmente este método es empleado principalmente en hongos esporulados como ya se mencionó, los cuales se han logrado preservar por periodos de 7 a 11 años, manteniendo su estabilidad morfológica y genética.^{8, 28}

Ventajas

- ⇒ Método simple y de bajo costo.
- ⇒ No requiere equipo especial
- ⇒ Estabilidad elevada
- ⇒ Ácaros no sobreviven a las condiciones del proceso
- ⇒ Inóculos sucesivos de un mismo tubo.

Desventajas

- ⇒ Método limitado a organismos esporulados.
- ⇒ Riesgo de contaminación por manipulación sucesiva.
- ⇒ Se debe verificar pureza y viabilidad periódicamente
- ⇒ Requiere precauciones en el tipo y esterilización de viales y sílica gel.^{8, 28}

Secado en suelo estéril: este método al igual que todos los que llevan a cabo un secado, presenta el mismo principio que éste último, con la diferencia de que el soporte principal es suelo estéril. El empleo de suelo estéril como soporte, se basó en el hecho de que el suelo es el habitat natural de numerosos microorganismos, por lo cual, su almacenaje en este les permite conservar su ambiente original.³⁵

Es un método empleado generalmente para la preservación de esporas de bacterias anaerobias (*Clostridium sp.*) y también para aerobias (*Bacillus sp.*). A su vez es factible para las esporas de hongos, las cuales pueden sobrevivir a las condiciones de secado, como lo encontró Pridham, Lyons and Phrompatina en 1973 y a mitad de 1800

se descubrió que varios cultivos de actinomicetos secados en suelo estéril sobrevivieron por 20 años. También se tienen reportes de hongos formadores de conidias y algas preservados mediante éste método con resultados satisfactorios, pero la técnica empleada no se indica. Aunque en la actualidad éste método ha limitado su uso a microorganismo esporulados.³⁵

Al utilizar este método, debe considerarse que primero se tiene que preparar el suelo, es decir, secarlo, para ello puede secarse a temperatura ambiente, sobre una superficie limpia y uniforme y después esterilizarse por dos días consecutivos, en autoclave a 121°C por 15 min..¹²

Para su realización, se requiere depositar 1 ml de una suspensión de esporas en agua en 5 gramos de suelo (20% de humedad y estéril), se deja crecer por 10 días a temperatura ambiente, a la vez que se seca mediante vacío o a temperatura ambiente. Su almacenamiento deberá ser de preferencia en el refrigerador a 5°C, con las precauciones necesarias en los envases que se utilicen para su almacenaje.^{28,8}

Este método ha sido satisfactorio para especies de *Fusarium*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Circinella* y *Penicillium*, los cuales sobreviven por 5 años sin presentar variaciones en sus características, así como algunas cepas del género *Clostridium* y *Bacillus*⁸

Ventajas

- ⇒ Estabilidad. (Mínimo cambio de morfología).
- ⇒ Buena sobrevivencia. (Longevidad aumentada)
- ⇒ Inóculos sucesivos de un mismo vial.
- ⇒ Baja infestación de ácaros.
- ⇒ Bajo costo de material y mano de obra.
- ⇒ Pronta disponibilidad de inóculos uniformes^{15,8}

Desventajas

- ⇒ Método limitado a organismos esporulados.
- ⇒ Riesgo de contaminación por manipulación sucesiva
- ⇒ Se debe verificar pureza y viabilidad periódicamente.
- ⇒ Requiere precauciones en la esterilización del suelo a emplear^{28,8}

Secado en discos o tiras de papel: método relativamente simple y barato de preservación de bacterias, en el cual el soporte principal son los discos o tiras de papel. En éste método varios discos contienen un determinado cultivo y pueden ser almacenados en un sólo tubo de ensayo, u otro recipiente con tapón de rosca y cubierto con papel aluminio. Cada disco puede ser retirado asépticamente con una pinza estéril y depositado en un medio adecuado.²⁰

El procedimiento consiste en embeber el papel estéril con una suspensión de células (concentración de 10^8 células o más por ml), y secarlos a temperatura ambiente o con vacío, de preferencia con este último para mantener la viabilidad, ya que se disminuye el tiempo de secado. Posteriormente se almacenan los discos o tiras de papel en tubos cerrados en un desecador, a temperatura ambiente o en refrigeración.^{8,24}

Una gran variedad de bacterias principalmente los de la familia *Enterobacteriaceae*, han sido preservadas satisfactoriamente con este método. A la vez ha sido aplicado en algunas levaduras y *Staphylococcus* (Coe y Clark, 1966).^{19,20}

Ventajas

- ⇒ Fácil manipulación.
- ⇒ Requiere materiales fáciles de conseguir.
- ⇒ Poco espacio para su almacenamiento.
- ⇒ Ideal para envíos por correo.^{8,20}

Desventajas

- ⇒ Tardanza en el proceso de secado.
- ⇒ No aplicable a microorganismos celulolíticos.
- ⇒ Fácil contaminación por manipulaciones sucesivas
- ⇒ Verificación de pureza, viabilidad y estabilidad constantemente.^{19,28}

Secado en discos de gelatina: en este método, originalmente descrito por Stamp (1947), los microorganismos son suspendidos en un medio de gelatina nutritiva y esta es solidificada en forma de discos en cajas petri. Los discos resultantes pueden ser secados o liofilizados, dando como resultado discos secos que son almacenados en viales que contienen sílica gel o pentóxido de fósforo, como agentes desecantes. Es apreciable que en esta variante del método de secado, el soporte principal es la gelatina nutritiva. Este método a su vez, presenta otras variantes como la descrita por Rayson,

que consiste en emplear celofán en las cajas de petri, en lugar de papel encerado, que es el que emplea Stamp. En general es un método simple, que puede llevarse a cabo en cualquier laboratorio.^{20, 7}

Un gran número de bacterias heterotróficas pueden ser mantenidas por este proceso, pero, pueden sufrir pérdida de su viabilidad. Aunque en el caso de los géneros *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, etc., se han obtenido elevados porcentajes de viabilidad, por períodos superiores a 4 años^{19, 20}

Ventajas

- ⇒ Larga viabilidad (en ciertos grupos de microorganismos).
- ⇒ Estabilidad de caracteres.
- ⇒ Método sencillo en cuanto a técnica.
- ⇒ Bajo costo. (No requiere material ni equipo costoso).^{19, 8, 28}

Desventajas

- ⇒ Posible riesgo de contaminación por manipulaciones sucesivas
- ⇒ Requiere de un control continuo de pureza, viabilidad y estabilidad.²⁰

Secado en discos de porcelana o chaquiras: el procedimiento fue inicialmente desarrollado por J. Lederberg y es recomendable para muchos tipos de bacterias, entre las que se encuentra el género *Enterobacteriaceae* y algunos hongos esporulados.⁵

La técnica consiste en realizar una suspensión celular empleando una solución de sacarosa al 20% (peso/volumen) o con algún otro agente crioprotector; e inocular cada disco de porcelana o chaquiras con 4 gotas de la suspensión. Se transfieren los discos a viales estériles, los cuales contienen un agente desecante. Así permanecen por una semana o más y posteriormente se almacenan a temperatura ambiente o a una temperatura de 4°C. Algunas variantes de este método consisten en el empleo de un desecador o bomba de vacío, para agilizar el proceso de secado^{5, 19}

Ventajas

- ⇒ Fácil manipulación.
- ⇒ Técnica sencilla y material fácil de conseguir.
- ⇒ Requiere un espacio reducido para su almacenaje.

Desventajas

- ⇒ Fácil contaminación por manipulaciones sucesivas.
- ⇒ Periodos prolongados de secado, lo que provoca disminución de viabilidad, cuando se seca a temperatura ambiente.
- ⇒ Verificación de pureza, viabilidad y estabilidad constantes.¹⁹

1.5.3 Métodos de preservación de largo plazo.

Dentro del tercer grupo de métodos de preservación encontramos el proceso de congelación y el de liofilización. Ambos son frecuentemente empleados para la preservación de microorganismos o sustancias biológicas, ya que permiten la restricción de la actividad del agua en ellos. Cuando dichos procedimientos son llevados a cabo apropiadamente, las funciones celulares son suspendidas temporalmente, pues todas las actividades metabólicas se detienen, ya que son mediadas por la actividad de las moléculas de agua, y como resultado los organismos pueden ser almacenados por determinado tiempo. Sin embargo, si estas operaciones que involucran muchas situaciones críticas en cada manipulación o si un paso en el proceso no se aplicó correctamente, los organismos no sobreviven.²¹

Es preciso mencionar, ciertos términos empleados en ambos procesos, que contribuyeron a su surgimiento, como métodos de preservación. La hipobiosis, que a su vez se ha subdividido en 1) letargo, en el que la actividad metabólica, aunque muy reducida, es apreciable y la 2) criptobiosis (a veces denominada anabiosis o vida latente), en el que la actividad metabólica esta ausente o es inapreciable. No hay duda de que una gran variedad de microorganismos pueden sobrevivir a una detención completa de su metabolismo. Por ejemplo, muchas algas, esporas de bacterias y de algunos hongos, y fragmentos de líquenes han sobrevivido a una exposición de dos horas a una temperatura de una fracción de grado por encima del cero absoluto. De esta manera se ha calculado entonces, que a -200°C , las reacciones químicas sencillas serían 8 millones de veces más lentas que a 20°C , de modo que a temperaturas todavía más bajas tienen que cesar por completo las complicadas reacciones que intervienen en el metabolismo; por lo tanto, la ausencia de actividad química a éstas temperaturas asegura el mantenimiento de la integridad estructural y por consiguiente la reanudación del metabolismo al volver a las condiciones normales.¹⁶

A continuación se detalla con precisión los métodos considerados de largo plazo:

Liofilización: algunas observaciones hechas en el siglo XVIII, permitieron conservar vivos ciertos microorganismos, por medio de la desecación de los mismos. Sin embargo, no fue sino hasta el principio de este siglo, que se anunciaron los principios de liofilización. La palabra "liofil" hace su aparición en 1939. Literalmente significa "amigo de los solventes", y en efecto los productos liofilizados se presentan bajo la forma de cuerpos sólidos, porosos, friables y ávidos de agua, el agua que precisamente les ha sido quitada.²

La liofilización es la remoción de agua de una suspensión de microorganismos congelados, por sublimación a una presión reducida (vacío), esto es, el agua es evaporada sin pasar por la fase líquida y producir así un material estable. Este proceso fue introducido por Flosdorf y Mudd en 1935.^{20, 2}

La liofilización ha sido largamente empleada para preservar diversos tipos de microorganismos, tales como levaduras, hongos, bacterias, y algunos virus, aunque es menos aplicado a algas e inadecuado para protozoarios. Cabe mencionar que se ha encontrado que las bacterias Gram-positivas sobreviven mejor que las bacterias Gram-negativas, aunque ello también suele depender del medio de suspensión que se utilice. Para el caso de microorganismos anaerobios, pueden verse afectados debido a la exposición que tienen con el oxígeno ambiental durante el proceso. Una variación de la liofilización denominada L-secado ha sido también usada en ciertos casos.^{24, 19}

Dada la gran aplicación de este método a varios grupos de microorganismos, se ha clasificado de diversas formas dependiendo del método y equipo empleados para su realización. De esta manera se tiene, en base a método

- 1) el precongelamiento + vacío y,
- 2) liofilización por centrifugación + vacío,

y en base a equipo :

- 1) Secado múltiple,
- 2) Secado en serie o colección y,
- 3) Secado a granel.

La elección del método depende del equipo con el que se cuente y en lo referente al equipo, cada uno está ideado para un propósito específico, ya que su uso depende del producto que se desee liofilizar.^{20, 8, 24}

Existen 5 fases o etapas fundamentales del proceso de liofilización. Estas son.

A) Preparación de la suspensión de microorganismos: para llevarla a cabo, se prepara un inóculo grueso suspendido en un medio de soporte, se depositan alicuotas en las ampollitas, y posteriormente se congelan. ^{19,20}

B) Congelamiento: generalmente se utilizan congeladores, pero en algunos casos se emplean mezclas de hielo y sal, o hielo seco, y en otros, especialmente los que se encuentran en plantas industriales, se cuenta con recipientes metálicos a los cuales se les recircula por sus paredes alcohol o salmuera por medio de un refrigerante mecánico. ¹⁵

C) Secado: este proceso involucra dos fases.

1) *Secado primario*: se elimina el agua de la humedad presente por sublimación, esto se logra a bajas presiones o con un desecador en presencia de vacío y un condensador (equipo con una superficie de metal frío sobre la cual las moléculas de agua son colectadas), esto deja de un 5-10% de humedad. En esta etapa se lleva a cabo el proceso de sublimación, cuyo porcentaje depende de la diferencia entre la presión de vapor del producto y la del condensador. La presión de vapor varía con la temperatura, es decir, a mayor temperatura del producto, la presión de vapor es mayor y un rápido secado primario puede ocurrir. Pero cabe señalar, que la temperatura del producto durante esta etapa requiere de un balance delicado entre la temperatura requerida para mantener un estado sólido de congelación de la suspensión y el máximo valor en la presión de vapor. ^{15, 28, 24}

2) *Secado secundario*: se eleva la temperatura de las ampollitas hasta 30-40°C, con esto solo queda del 1-2% de humedad. En el secado secundario se requiere de baja presión, baja temperatura del condensador y de una directa aplicación de calor ambiental al producto. ¹⁵

Estas etapas, a su vez, se ven influenciadas por varios factores, como:

- a) Tipo de células.
- b) Condiciones de crecimiento y edad del cultivo.
- c) Concentración celular.
- d) Medio de suspensión (agentes crioprotectores)
- e) Métodos de secado (humedad residual).

Después de ésta etapa las ampollitas se sellan bajo condiciones de vacío. ^{8, 24}

- D) Rehidratación y Control de Calidad. apertura de ampolletas, para hidratar el producto liofilizado, y someterlo a pruebas de pureza, viabilidad y estabilidad. Adicional a esto, las ampolletas se etiquetan por dentro al inicio del proceso y por fuera después del sellado. Se hacen cuentas viables antes y después de liofilizar, anotando la fecha y el número de bacterias resultantes en la tarjeta de identificación correspondiente a cada cepa. ^{19, 8, 24}
- E) Almacenamiento: este puede ser, bajo condiciones de refrigeración o a temperatura ambiente, y de preferencia evitando el contacto con la luz. ^{19, 20}

Además de las etapas anteriores, existen otras que complementan el proceso, las cuales se enlistan a continuación:-

1.- Preparación de ampolletas

Las ampolletas deben ser de vidrio neutro, suave, no alcalino, pues dada la resistencia a la ruptura de éste último, hace más difícil el proceso de sellado, ya que prolonga el tiempo que se expone a la flama del tanque de oxígeno-gas, elevándose de esta manera la temperatura interna de la ampolleta, influyendo en la estabilidad del producto liofilizado, ya que puede llegar a quemarse, matando así a los microorganismos. Además que durante el proceso de rehidratación, al requerir la apertura de ampolletas, el proceso se complica. ^{24, 20, 19}

2.- Sellado de ampolletas

El uso de un cuarto estéril o mantenido como área cerrada es recomendado para el sellado de ampolletas, para evitar contaminaciones posibles durante el contacto de las ampolletas con el medio ambiente durante el tiempo que requieran para su sellado. También puede emplearse la radiación ultravioleta sobre la superficie de trabajo durante 30 min. antes de ser usada, ello permite una reducción en el nivel de contaminación atmosférica, al igual que el uso de máscaras, o cubrebocas se emplean como medidas preventivas para la disminución del riesgo de contaminación con la flora bacteriana del tracto respiratorio del personal. ²⁴

Es recomendable que una vez terminado el proceso de liofilización inmediatamente se sellen las ampolletas, para tener un tiempo de sellado de 1 hora a hora y media, aunque ello depende de la cantidad de ampolletas que se hayan liofilizado. En caso de que el sellado se realice varias horas después se

deben de colocar las ampollitas en un desecador para evitar cualquier tipo de contacto con el oxígeno ambiental.^{24, 19}

3.- Determinación de la humedad residual del producto liofilizado

La humedad residual del material liofilizado, se expresa en porcentaje de humedad del total del peso del producto. Un método para determinarla es medir el peso del liofilizado y después eliminar toda la humedad residual mediante secado o empleando agentes desecantes como el pentóxido de fósforo, este proceso se detiene, hasta obtener un peso constante del liofilizado. La diferencia entre el peso del producto inicial y el del producto seco, expresado en porcentaje considerando el peso inicial del liofilizado, es el porcentaje de humedad residual del producto. Este método se denomina gravimétrico. Otros métodos incluyen cromatografía de gases ó el procedimiento de Karl-Fisher que involucra tratamiento químico. Cabe señalar que todos los métodos de análisis de la humedad residual son destructivos para el producto.^{24, 35, 39}

Una vez finalizado el proceso de liofilización, y almacenado los cepas, aún existen ciertos puntos a considerar, ya que estos influyen en la estabilidad del liofilizado durante el período de almacenaje. Principalmente durante este período ocurre.

- 1) Oscurecimiento no enzimático.
- 2) Desnaturalización proteica.
- 3) Destrucción de nutrientes.
- 4) Oxidación de lípidos.
- 5) Ruptura de ácidos nucleicos.

Tales eventos no se encuentran perfectamente esclarecidos, es decir, se desconoce en algunos aspectos como suceden, sin embargo, es importante considerarlos.^{8, 28}

Por otro lado, la estabilidad química del producto también se ve afectada por la temperatura, ya que ésta influye en la velocidad de reacción, contenido de humedad y presencia de oxígeno. La velocidad de las reacciones metabólicas aumenta conforme se incrementa el nivel de temperatura, dando como resultado alteraciones en la estructura molecular de la célula, debido a una desnaturalización proteica, ocasionada por la elevación de la temperatura. El contenido de humedad en el almacenaje es variable, por que a altas temperaturas se involucra un bajo contenido de humedad, mientras que a

temperaturas menores se tiene un mayor contenido de humedad. La presencia de oxígeno ocasiona que las cepas aerobias, continúen con su metabolismo, disminuyendo el tiempo de viabilidad de la cepa, además provoca que las cepas anaerobias mueran rápidamente. Por otro lado, el peso de la estructura molecular del medio de suspensión también influye en la estabilidad estructural de la muestra, ya que, a menor peso molecular, menor nivel (número) de ligandos; a la vez un nivel elevado en la temperatura de la muestra y un mayor contenido de humedad pueden causar algunas modificaciones de color y textura en el liofilizado y ello posiblemente altera la viabilidad y estabilidad del microorganismo (propiedades bioquímicas) durante el tiempo de almacenaje.^{8, 39, 24}

Ventajas

- ⇒ Sellamiento total de la muestra y protección contra contaminación.
- ⇒ Viabilidad prolongada.
- ⇒ Estabilidad de caracteres en muchos grupos de microorganismos.
- ⇒ Se puede realizar una producción a gran escala de un mismo microorganismo.
- ⇒ No se requiere almacenamiento especial, sólo protección de la luz.

Desventajas

- ⇒ Muchas especies no sobreviven al proceso.
- ⇒ En muchos casos el porcentaje de viabilidad final disminuye y por tanto los liofilizados no deben ser usados directamente, sin previo control de calidad.
- ⇒ Daños genéticos pueden ocurrir, aunque cuando la viabilidad es alta se vuelve difícil la diferenciación entre colonias mutantes resultantes del proceso de liofilización y las que no lo son.
- ⇒ Costo elevado.
- ⇒ Personal especializado^{24, 8, 19}

Congelamiento: el almacenaje de microorganismos a temperaturas ultrabajas ha demostrado que bajo estas condiciones, se conserva su viabilidad, pureza y estabilidad. Mediante este método se induce un estado de hipobiosis durante el cual el organismo no sufre ningún cambio fenotípico o genotípico si se lleva a cabo un adecuado control del congelamiento y descongelamiento.^{24, 36}

El efecto de conservación del congelamiento es posible, ya que, a muy bajas temperaturas las actividades enzimáticas son insuficientes para permitir el metabolismo

microbiano a las velocidades necesarias para la reproducción y, en consecuencia, la reproducción microbiana se detiene. A diferencia del calor las bajas temperaturas no desnaturalizan las proteínas, por el contrario los microorganismos se conservan en estado latente ¹

Este método puede ser aplicado tanto para cultivos esporulados como los no esporulados y aquellos que no soporten las condiciones de otros métodos de preservación. ^{20, 19}

Dentro de este método se manejan un serie de rangos de temperatura, como son: -20°C, -30°C, -40°C, -70°C, -140°C y -196°C, todas estas temperaturas han sido usadas, pero en general, temperaturas cerca de -30°C han dado resultados no satisfactorios, debido a la formación de mezclas eutécticas (soluciones que tienen el menor punto de fusión constante posible) que exponen a las células a una alta concentración de sales. Mientras que en las de -70°C, -140°C y -196°C sucede todo lo contrario. ^{20, 42, 19}

Para realizar este método se debe tener precaución de no dañar a los microorganismos, tomando en cuenta la siguientes puntos:

- a) Velocidad de enfriamiento: debe ser lenta hasta -20°C y después tan rápida como sea posible hasta alcanzar la temperatura de congelación.
- b) La cantidad de electrolitos en el medio debe ser mínima.
- c) Los medios de soporte como glicerol, o dimetil sulfóxido sirven para proteger a la bacteria durante los cambios físico-químicos que se llevan a cabo durante la congelación, al realizar tal función de protección, dichas sustancias reciben el nombre de agentes crioprotectores.
- d) Las bacterias se pueden dividir en resistentes y sensibles a la congelación. La mayoría de las bacterias comunes pertenecen al primer grupo, mientras que entre los segundos se pueden citar a: *Neisseria sp* y *Haemophilus sp*. Las sensibles a la congelación pueden soportar el sobre enfriamiento y si se llevan rápidamente a una temperatura baja sin cambio de fase, pueden sobrevivir perfectamente
- e) La velocidad de descongelación debe ser tan rápida como sea posible. ^{15, 28, 24}

También pueden ser considerados el tipo de refrigerador a utilizar y el material de los viales o frascos en los cuales se almacenarán los cultivos, aunque éstos no tienen tanta significancia como los anteriores ²⁰

La congelación se puede lograr mediante congelación normal (-20°C), almacenando la cepa en presencia de CO₂ sólido (-70), en un congelador potente como el REVCO (-70°C) o congelando las muestras y almacenándolas con N₂ líquido (ultracongelación a -170°C).²⁴

Dado que se han manejado diferentes rangos de temperaturas para el proceso de congelación, a continuación se enlistan y describen más detalladamente:

Almacenaje entre -17°C y -24°C

Cuando las células se someten a este rango de temperatura, en el medio interno hay mayor cantidad de vapor de agua que tiende a compensarse por deshidratación, el agua líquida del interior pasa a su estado sólido, lo que determina la formación de cristales que lesionan las estructuras internas y la membrana produciéndose la lisis durante la descongelación. En este rango generalmente no se lleva a cabo un control estricto del congelamiento y los cultivos son simplemente colocados en el congelador en suspensiones que contienen agentes crioprotectores.^{36, 24}

Almacenaje abajo de -30°C

En este rango se lleva a cabo un control más frecuente y rígido de la temperatura de congelamiento y conforme disminuye la temperatura se emplean mayor número de agentes crioprotectores.^{20, 24}

Almacenaje a -70°C y -80°C

El almacenaje a -70°C fue sugerido por Feltham y colaboradores en 1978. En este método se emplean pequeños viales para almacenar los cultivos, y el glicerol como agente crioprotector. El procedimiento es muy rápido y fácil, además no requiere de una manipulación continua durante su almacenaje. Requiere poco espacio para guardarlos. Generalmente es el apropiado para preservar grandes colecciones de microorganismos en espacios pequeños. Su desventaja consiste en que el equipo es altamente costoso y se debe contar con un buen servicio de energía eléctrica que no permite interrupción de la misma en el equipo. Además de la temperatura de -70°C, las temperaturas más comúnmente usadas son las de -75°C y -80°C, éstas pueden virtualmente garantizar que no ocurran reacciones químicas, más no es cierto que otros cambios físicos que afectan a la célula dejen de ocurrir. Varias especies de levaduras han sido almacenadas a -80°C

en glicerol al 10% sobreviviendo por un período de 2 años (Mikata y Banno, 1987), otras bacterias han sido guardadas a -76°C en perlas de vidrio (Jones y col. 1987) con resultados satisfactorios, mientras que en lo referente al reino fungi, Ito y Yokoyama (1987) registraron que 865 basidiomicetos sobrevivieron por 5 años a -70°C en presencia de glicerol al 10% ^{19, 8}

Almacenaje a -135°C y -150°C

Más recientemente se han empleado cámaras a bajas temperaturas que permiten un almacenaje a temperaturas entre -135°C y -150°C , bajo éstas últimas condiciones se ha garantizado que las células sean mantenidas a temperaturas abajo de aquellas que provocan cambios en su estructura. ^{24, 8}

En general para el método de congelamiento podemos citar las siguientes ventajas y desventajas:

Ventajas

- ⇒ Viabilidad y estabilidad prolongada.
- ⇒ Requiere un espacio reducido para el almacenaje de cultivos.

Desventajas

- ⇒ Equipo costoso.
- ⇒ Dificultad para el envío de cultivos.
- ⇒ Dependiente del sistema de electricidad. ^{19, 36}

Almacenaje en nitrógeno líquido: de acuerdo a ciertos estudios de investigación se ha demostrado que colocando las células a una temperatura de nitrógeno líquido (-196°C), se promueve la deshidratación celular reduciéndose la probabilidad de formación intracelular de cristales de hielo, aunque algunos hongos mueren por el "stress", ya que se genera un encogimiento de las hifas por la deshidratación. En este método también se han tenido fracasos principalmente en algunos hongos y levaduras, primordialmente por daños ocasionados por el congelamiento, como lo es, la formación de cristales de hielo intracelulares y efectos de deshidratación. Así mismo, la membrana celular es un sitio que se lesiona debido a las bajas temperaturas. ^{8, 2, 19}

La ultracongelación como también se le ha denominado a este método, se ha empleado para preservar un amplio espectro de células biológicas entre otros, hongos, bacteriófagos, protozoarios, algas, células de mamíferos y bacterias. ^{15, 2}

La congelación y el mantenimiento de células y tejidos cerca del cero absoluto con nitrógeno líquido ha originado la especialidad llamada criobiología. Aunque esta tiene mayor aplicación en la preservación de células humanas, animales y vegetales que en la preservación de microorganismos.³⁷

En lo que se refiere a la técnica, para el caso de hongos, se realiza una suspensión de esporas en glicerol al 10% y alícuotas de 0.5 ml son distribuidas en ampollitas de vidrio de borosilicato o criotubos de 1 ml y marcados con el número del cultivo. Las ampollitas o criotubos son sellados y colocados en un baño con colorante y refrigerados de 4 a 8°C por 30 min. para un pre-enfriamiento, este procedimiento permite que el glicerol penetre y envuelva al organismo y la presencia del colorante dentro de los criotubos indica fallas en el sellado. En caso de no haber fallas en el sellado de los criotubos, se congelan a -35°C de 45 a 60 min., para posteriormente ser colocadas en nitrógeno líquido y congeladas rápidamente a -196°C. Para el caso de bacterias se realizan los mismos pasos, con la única diferencia de que se prepara una suspensión celular y no de esporas.^{5, 28, 20}

Para la reactivación se colocan los criotubos en un baño con agua a 37°C de manera rápida, deritiéndose la muestra. Entonces los criotubos son abiertos y se toma una alícuota que se deposita en un medio de cultivo adecuado para el crecimiento del microorganismo en cuestión.^{20, 19}

El medio de suspensión a utilizar en los microorganismos que son congelados es usualmente, el que contiene DMSO (dimetil sulfóxido) como crioprotector o el glicerol. Existen muchos otros compuestos que han demostrado resultados satisfactorios al ser empleados como crioprotectores. La polivinil-pirrolidona, dextranas, etileno, glicol, propileno glicol, acetamina o uréa. Mezclas de crioprotectores también han sido utilizadas, como por ejemplo: DMSO y glucosa en el caso de hongos, glicerol con lactosa, maltosa o rafinosa para algunas bacterias y algas.^{5, 8}

Precauciones

En algunas ocasiones sin quererlo se puede tener contacto del nitrógeno con algunas partes de la piel, como en manos o brazos, ocasionando quemaduras. En otras ocasiones por salpicaduras al depositar los contenedores, se tiene contacto del nitrógeno líquido con los ojos. Por ello es necesario tener cuidado al depositar los contenedores, es decir, que esto se realice lentamente para evitar salpicaduras. Otras medidas preventivas son el uso de goggles, guantes, y en algunos casos zapatos especiales.

También se recomienda que si se emplea nitrógeno líquido se cuente con un área bien ventilada, ya que el nitrógeno líquido puede empezar a evaporarse y el porcentaje de oxígeno disminuye notablemente en el ambiente. Además la exposición del nitrógeno líquido con el aire del medio ambiente, ocasiona que el oxígeno del aire se condense en el nitrógeno líquido, puesto que este es más frío que el oxígeno. Si este proceso continúa por un período prolongado de tiempo, el oxígeno presente en el nitrógeno líquido crea un peligro de combustión.^{2, 5}

Ventajas

- ⇒ Los cultivos son mantenidos en condiciones estables por períodos muy largos.
- ⇒ Los cultivos pueden ser completamente sellados, libres de cualquier contaminación.
- ⇒ Bacterias y hongos (esporulados y no esporulados) presentan una elevada viabilidad, después de períodos prolongados de almacenaje..

Desventajas

- ⇒ El suministro continuo de nitrógeno líquido es costoso.
- ⇒ Elevada dependencia de servicios externos para su continuidad.
- ⇒ Dependiendo de la importancia del laboratorio es necesaria una buena infraestructura de modo que permita cubrir eventuales daños causados por interrupción en el sistema eléctrico, accidentes de vaciamiento, etc..
- ⇒ Posibles accidentes si no se llevan a cabo las precauciones necesarias ^{8, 20, 19}

Comparación entre los métodos de preservación

Tomando en cuenta todos los métodos mencionados, con sus ventajas y desventajas pareciera que el almacenaje en nitrógeno líquido es el que proporciona resultados más seguros, pero con todo y sus múltiples ventajas, por varias razones puede ser que no sea disponible en muchos laboratorios o que no sea el ideal para el tipo de microorganismo a preservar, de igual manera podemos encontrar alguna desventaja adicional en cada uno de los métodos mencionados, que impida que sean utilizados, ello nos indica, que no existe un método universal de preservación, que permita su aplicación a todos los microorganismos con excelentes resultados. Ante tal situación se recomienda que sea cual fuera el método que se emplee se cuente a la vez con otro método que

sirva de reserva o soporte en los casos que ya no funcione el método que en un inicio dio resultados satisfactorios.^{8, 24, 36}

1.6 Métodos para el Control de Calidad

El mantenimiento de una eficiente colección de cultivos depende principalmente de un rígido control de calidad de los microorganismos preservados, de tal manera que se asegure su autenticidad, pureza, viabilidad y estabilidad. El Control de Calidad es indispensable puesto que los microorganismos son muy propensos a contaminaciones, o cambios genéticos principalmente, y por lo tanto, es necesario un monitoreo continuo.⁸

Para realizar el control de calidad se parte de los cultivos a examinar y se les somete a prueba de viabilidad: siembra en placa, pureza: examen microscópico y macroscópico en placa, y estabilidad: pruebas bioquímicas típicas y serológicas.^{8, 24}

Viabilidad (Conteo de células viables).

El resultado en el porcentaje de sobrevivencia, depende de la naturaleza del microorganismo preservado, del método de preservación que se ha aplicado y del método a usar para estimar la viabilidad de las células. El conteo de células viables es generalmente efectuada antes y después del proceso de preservación y también a intervalos de tiempo definidos que permitan medir el decaimiento en la viabilidad de la cepa. Por ejemplo, en el caso de la liofilización, se efectúa un pre y post-conteo y después al año, a los 3, 5 ó 10 años, etc..⁸

Para realizar la prueba de viabilidad en productos liofilizados y congelados se siguen los siguientes pasos: una ampollita liofilizada es abierta asépticamente con una lima y reconstituida con caldo ó agua destilada estéril. En el caso del congelamiento, una muestra es fundida por inmersión en un baño a 30°C. y tres gotas (aprox. 0.1 ml) se suspenden en 10 ml de agua destilada estéril (dilución de 10^{-2}) y se homogeneiza cuidadosamente. Esta muestra a su vez es diluida en serie hasta llegar a una dilución e 10^{-6} . Posteriormente en una placa con medio adecuado es dividida en 4 cuadrantes, y en cada cuadrante se colocan cuidadosamente 3 gotas espaciadas, de las últimas cuatro diluciones.⁸

Se incuba en condiciones de crecimiento bacteriano. El número de colonias presentes por las tres gotas de la dilución ayudarán a estimar la viabilidad de la siguiente manera:

$$\text{Viabilidad} = n^2 \text{ de colonias en 3 gotas} \times 10 \times \text{recíproco de la dilución}$$

Al mismo tiempo, una gota de la suspensión original es también inoculada por la técnica de agotamiento en una placa con medio adecuado. Esta placa es usada para monitorear cambios morfológicos y pureza de la cepa. Cabe mencionar que es vital que todos los datos de las características de cada uno de los cultivos sean registrados en archivos, en computadoras o en bitácoras que permitan tener un seguimiento de cada cepa.⁸

Otro método que se puede emplear es el de Miles y Misra modificado, el cual consiste en suspender el liofilizado con 1 ml de caldo nutritivo u otro medio líquido (dilución 10^{-1}) luego se efectúan una serie de diluciones, colocando 0.1 ml de la suspensión en 0.9 ml de caldo nutritivo y así sucesivamente hasta obtener una dilución de 10^{-6} .¹⁵

Cada una de las diluciones se siembra en una sola placa de agar sangre (u otro medio dependiendo del microorganismo a evaluar), colocando una gota de la dilución y se incuba para contar el número de unidades formadoras de colonias por ml de suspensión bacteriana.¹⁵

La prueba de viabilidad se recomienda realizarla por lo menos dos veces al año de tal manera que al liofilizar una cepa se considere el número apropiado de ampollitas para tener un número suficiente que permita verificar su viabilidad y surtir pedidos, y lo principal, que es la estimación del tiempo que durará el microorganismo bajo esas condiciones.¹⁵

Pureza

Esta prueba es la más fácil de todas las que se realizan, sin embargo el resultado de ésta influye grandemente en las demás. Se realiza conjuntamente con la prueba de viabilidad, ya que una vez realizadas las diluciones correspondientes del liofilizado a probar, se toma una alícuota del tubo original y se siembra por agotamiento en una placa de agar y se incuba a la temperatura óptima del microorganismo en estudio. Después del

período de incubación, las colonias presentes en la placa servirán para evaluar su pureza, es decir, se realiza una tinción de gram a las colonias presentes, así como una evaluación de las características macroscópicas (morfológicas y coloniales) que presenten. Si a simple vista se aprecia un solo tipo de colonias, los resultados obtenidos de la tinción de gram indican un solo microorganismo, y las características macroscópicas corresponden con las reportadas en la bibliografía para el microorganismo en estudio, se puede decir que la cepa evaluada está pura ⁸

Estabilidad

Una vez aprobadas las pruebas de viabilidad y pureza, a partir de las colonias resultantes de tales pruebas, se siembra una placa de agar mediante la técnica de agotamiento, para obtener un cultivo joven, de 18 a 24 hrs. de incubación o más, dependiendo del microorganismo. Posteriormente se toman asadas de esta placa y se inoculan en la serie de pruebas bioquímicas a probar. Se incuban bajo condiciones de crecimiento bacteriano. Al término de la incubación se realiza la lectura de pruebas bioquímicas.

Si la lectura de las pruebas bioquímicas, coincide con las establecidas, significa que el microorganismo presenta una estabilidad satisfactoria. Es necesario anotar todos los resultados obtenidos y programar el siguiente chequeo.

En caso de que la estabilidad sea insatisfactoria debe prepararse una nueva serie de pruebas que serán aplicadas a otra ampollita o a una más reciente, anotando todos los resultados. Esta serie de pruebas permitirán determinar las mejores condiciones de mantenimiento dependiendo de las características de cada cepa, además de considerar métodos alternativos de preservación.

Es importante, que cuando se realice el control de calidad de un microorganismo, del cual se tienen varios lotes, lo recomendable es probar una ampollita o vial del lote más antiguo con el que se cuente, anotando siempre el número de lote, clave de preservación y todo dato útil. ⁸

1.7 Microorganismos utilizados

Los organismos vivos pueden clasificarse de diversas formas dependiendo de el principio en el cual se base dicha clasificación, por ello se harán mención solamente de dos clasificaciones, puesto que éstas son las más recientes. ⁴

Desde el punto de vista de evolución molecular de los organismos, se dividen en tres grupos: *Eubacteria*, *Archaeobacteria* y *Eucariontes*. Aunque *Eubacteria* y *Archeobacteria* son procariontes, desde el punto de vista evolutivo molecular se consideran diferentes. Dichos grupos se encuentran conformados de la siguiente manera:

Eubacteria

bacterias gram positivas
bacterias púrpura
Cianobacteria
Flavobacteria
Thermotoga
Aquifex

Archaeobacteria

Halobacterium
Metanobacterium
Thermoproteus
Methanococcus
Thermococcus
Thermoplasma
Methanopyrus
Pirodictium

Eucariontes

Entamoebae
Hongos
Animales
Plantas
Ciliados
Flagelares
Microsporidia
Diplomonados

Esta clasificación es la más reciente, y fue publicada en Abril de 1997 en la revista *Scientific American* (Madigan T. Michael y Marrs) De acuerdo a esta clasificación los microorganismos con los que se trabajará, que son cocos gram

positivos, corresponden al grupo de bacterias gram positivas pertenecientes a su vez al grupo eubacteria o bacteria.²⁷

La segunda clasificación es la que se menciona en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9ª ed., publicado en 1986. Esta clasificación se base en la composición de pared celular, características microscópicas, pruebas bioquímicas, entre muchas otras características; en ella el grupo de cocos gram positivos, consta de 15 diferentes géneros de microorganismos. Las características que tienen en común éstos géneros son: el ser organismos gram positivos, quimiorganotróficos, mesofílicos y no esporulados. Este grupo de cocos gram positivos, se encuentra dividido en dos grupos, en base a la ausencia o presencia de la enzima catalasa y de citocromos. Dentro del grupo catalasa positivo, se encuentran:

Familia I *Micrococaceae* y Familia II *Deinococcus*
Géneros I *Micrococcus*
 II *Stomatococcus*
 III *Planococcus*
 IV *Staphylococcus*

El segundo grupo (catalasa negativo), se subdivide a su vez en otros dos grupos. El primero formado por microorganismos anaerobios facultativos o microaerofílicos y el segundo por microorganismos anaerobios estrictos. Estos grupos se encuentran conformados por los siguientes géneros:

Grupo I	Grupo II
<i>Streptococcus</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Ruminococcus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Coprococcus</i> y,
<i>Aerococcus</i> y,	<i>Sarcina</i>
<i>Gemella</i>	

En base a ésta segunda clasificación, en el presente estudio se trabajará solamente con los siguientes géneros: *Micrococcus* y *Staphylococcus* de la Familia I, y con los géneros *Streptococcus* y *Leuconostoc*, pertenecientes al grupo de organismos catalasa negativos, anaerobios facultativos o microaerofílicos. Debido a que el estudio fue diseñado para aplicar en los microorganismos que se encuentran dentro de éstos

géneros, y además son los de mayor uso continuo, es decir son microorganismos importantes desde el punto de vista didáctico y clínico. ¹⁷

1.7.1 *Staphylococcus*

El nombre de *Staphylococcus* procede del término griego "racimo de cocos" El género *Staphylococcus* pertenece a la familia *Micrococcaceae*, la cual consta a su vez de 4 géneros. Actualmente se conocen un total de 27 especies y 7 subespecies en el género, con 14 especies y 2 subespecies halladas en humanos. Las especies asociadas más frecuentemente con infecciones humanas son *S aureus* (el miembro más virulento y mejor conocido del género), *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus* y *S schleiferi*. ^{30, 21}

Los estafilococos son considerados patógenos humanos importantes, causantes de una amplia variedad de enfermedades, desde infecciones cutáneas superficiales hasta enfermedades sistémicas potencialmente letales. ²²

Los estafilococos pueden producir enfermedad tanto por su capacidad para multiplicarse y extenderse con amplitud por los tejidos, como por la producción de muchas sustancias extracelulares; algunas de éstas sustancias son enzimas y otras se consideran toxinas. ³⁸

Este grupo de microorganismos normalmente se encuentran en piel y mucosas de humanos, así como en otros mamíferos y aves. ¹⁷

Características microscópicas

Son cocos gram positivos de 0.5 a 1.5 μ de diámetro, se encuentran agrupados en pares, tetradas, cadenas cortas (no más de 4 células), o en forma irregular lo que los hace parecer como racimos de uvas, consecuencia de su división en más de un plano. No poseen flagelos ni esporas y sólo algunas cepas son capsuladas. ^{17, 13}

Características macroscópicas

Generalmente, las colonias estafilocócicas son relativamente grandes de 2 a 3 mm, después de 24 h. de incubación a 37°C o hasta de 7 mm después de 48 a 72 h.; además son opacas, convexas, de consistencia cremosa y suelen presentar pigmentos carotenoides, que van desde el color blanco al amarillo dorado, el cual varía dependiendo de la especie y del medio del cultivo en el que se encuentren. Su

crecimiento en agar sangre pone de manifiesto hemolisinas estafilocócicas, tales como la alfa, beta, gama o delta.^{17, 13}

Características bioquímicas

Son anaerobios facultativos, catalasa positiva y su metabolismo es respiratorio y fermentativo. Son sensibles a la lisis por la lisostafina endopeptidasa, pero resistentes a la lisis por lisozima. El porcentaje de G + C en el DNA es de 30 a 40 moles. Utilizan una gran cantidad de carbohidratos bajo condiciones aerobias, dando origen a la producción de ácido. Bajo condiciones anaeróbicas el principal producto de la fermentación de glucosa es el ácido láctico, y bajo condiciones aerobias es el ácido acético junto con una pequeña cantidad de CO₂. Su pared celular está formada de peptido glicano ó mureína y ácido teicoico. El diaminoácido presente en el peptidoglicano es la L-lisina, en tanto que el puente interpeptídico es una oligolisina, susceptible a la lisostafina. Dependiendo de la especie, el ácido teicoico puede ser poliofosfato, o poliglicerolfosfato-glicosilfosfato.^{17, 13, 23}

Toxinas estafilocócicas

S. aureus produce un gran número de factores de virulencia que incluyen por lo menos 5 toxinas citolíticas dañinas para las membranas (alfa, beta, delta, gamma y leucocidina), así como toxina exfoliativa, toxina 1 del síndrome del shock tóxico y cinco enterotoxinas.^{30, 13}

Enzimas estafilocócicas

Coagulasa: las cepas de *S. aureus* posee dos formas de coagulasa: la de unión (llamada también factor de agrupamiento) y la libre

Catalasa: todos los estafilococos la producen. Actúa como enzima protectora, catalizando la conversión del H₂O₂ tóxico.

Hialuronidasa: facilita la diseminación de *S. aureus* en los tejidos.

Fibrinolisis: llamada también estafilocinasa, es producida prácticamente por todas las cepas de *S. aureus*.

Lipasas: todas las cepas de *S. aureus* y más del 30% de los estafilococos coagulasa negativos producen varias lipasas diferentes.

Nucleasa: otro marcador de *S. aureus* es la presencia de esta enzima, cuyo papel es desconocido.^{30, 22, 21, 13}

Condiciones de crecimiento

Su temperatura óptima oscila entre 28 y 35°C y su pH óptimo entre 7.0 y 7.5, con excepción de especies anaeróbicas como *S. saccharolyticus* y algunos cultivos de *S. aureus*. Algunas especies requieren la presencia de CO₂ para su crecimiento y otras con deficiencias en su pared celular requieren de un ambiente hipertónico. Son capaces de crecer en un medio con el 10% de NaCl y algunos otros cultivos suelen crecer en medios con 15% de NaCl o 40% de bilis.^{17, 30}

Cultivo y aislamiento

Los medios de cultivo que carecen de tiamina y ácido nicotínico no favorecen su desarrollo; sin embargo en los medios mínimos suelen existir cantidades pequeñas de estas vitaminas. Su crecimiento en agar sangre es más abundante. Cuando los cultivos de estafilococos se encuentran contaminados se pueden emplear medios selectivos como agar sal manitol, agar Columbia, agar lipasa sal manitol o agar fenilalcohol, ya que éstos medios inhiben el crecimiento de gram-negativos y a determinados gram positivos.^{23, 22}

Colección, transporte y almacenaje de cultivos

No se requiere de precauciones o métodos especiales para el transporte y almacenaje de estafilococos pues son lo suficientemente resistentes a la desecación, y a cambios moderados de temperatura. Han sido preservados satisfactoriamente mediante liofilización y secado.^{22, 21}

En la Tabla 1 se enlistan una serie de pruebas, que permiten la identificación de las diferentes especies del género *Staphylococcus*.

Tabla 1

Diferenciación bioquímica de las especies del Género *Staphylococcus*

Especie	CARACTERÍSTICAS																
	Tamaño de la colonia (grande) ^a	Pigmento colonial ^b	Crecimiento anaeróbico	Crecimiento aeróbico	Elastiflocagulasi	Factor de agrupamiento	Nucleasa termoestable	Hemolisinas	Catalasa	Oxidasa	Fosfatasa alcalina	Arginina amidhidrolasa	Pirrolidoni amidhidrolasa	Omitina descarboxilasa	Ureasa	Beta glucosidasa	Beta galactosidasa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	d	+	-
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	-	-	(+)	(+/-)	+	-	+	+	-	-	+	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	+	-	-	-	(d)	+	-	+	-	-	(d)	+	(d)	-
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	-	(+)	+	-	-	-	(d)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	-	(d)	(+)	+	-	-	-	(d)	+	-	-	(d)	-	-	+	-	-
<i>S. caprae</i>	d	-	(+)	+	-	-	-	(d)	+	-	(+)	-	d	-	+	-	-
<i>S. saccharolyticus</i>	-	-	+	(+/-)	-	-	-	-	-	-	d	-	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. warneri</i>	d	d	+	+	-	-	-	(d)	+	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>S. haemolyticus</i>	+	d	(+)	+	-	-	-	(+)	+	-	-	+	-	-	-	d	-
<i>S. hominis</i>	-	d	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	d	d	+	+	-	(+)	-	(+)	+	-	-	+	+	d	+	-	-
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	-	-	+	+	-	+	+	(+)	+	-	+	-	+	-	-	-	(+)
<i>S. auricularis</i>	-	-	(+/-)	(+)	-	-	-	-	+	-	-	+	d	-	-	-	(d)
<i>S. saprophyticus</i>	+	d	(+)	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	d	+
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	d	-	d	+	-	-	-	(d)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	+	d	(+)	+	-	-	-	(d)	+	-	+	-	d	-	+	-	+
<i>S. xylosus</i>	+	d	d	+	-	-	-	-	+	-	d	-	d	-	+	+	+
<i>S. kloosii</i>	d	d	-	+	-	-	-	(d)	+	-	d	-	d	-	d	d	d
<i>S. equorum</i>	-	-	-	(+)	-	-	-	(d)	+	-	(+)	-	-	-	+	ND	d
<i>S. arlettae</i>	d	+	-	+	-	-	-	-	+	-	(+)	-	-	-	-	ND	d
<i>S. gallinarum</i>	+	d	(+)	+	-	-	-	(d)	+	-	(+)	-	-	-	+	+	d
<i>S. simulans</i>	+	-	+	+	-	-	-	(d)	+	-	(d)	-	+	-	+	-	+
<i>S. carnosus</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>S. intermedius</i>	+	-	(+)	+	+	d	+	d	+	-	+	+	+	-	+	d	+
<i>S. delphini</i>	+	-	(+)	+	+	-	-	+	+	-	+	ND	ND	ND	+	ND	ND
<i>S. hyicus</i>	+	-	+	+	d	-	+	-	+	-	+	-	-	-	d	d	-
<i>S. chromogenes</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+	d	-
<i>S. caseolyticus</i>	-	d	(+/-)	+	-	-	ND	-	+	+	-	ND	+	-	-	-	-
<i>S. sciuri</i>	+	d	(+)	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>S. lentus</i>	-	d	(+/-)	(+)	-	-	-	-	+	+	(+/-)	-	-	-	-	+	-

Símbolos: +, 90% o más de los cultivos dan reacción positiva; +/- 90% o más de los cultivos dan reacción positiva retardada; -, 90% o más de los cultivos dan reacción negativa; d, del 11 al 89% de los cultivos dan reacción positiva; ND, no determinada; () reacción retardada.

^a Se considera positiva si el diámetro de la colonia es mayor o igual a 6 mm después de incubación a 35°C por 48 hrs.

^b Se considera positiva si se detecta visualmente la presencia de pigmentos carotenoides (amarillo, amarillo-naranja, naranja) durante su crecimiento a 35°C

Fuente: Albert Balows, *Manual of Clinical Microbiology*, 1991

Tabla 1 Continuación

Diferenciación bioquímica de las especies del Género *Staphylococcus*

Especie	Características							Producción de ácido a partir de (aeróbicamente):									
	Beta glucoronidasaa	Utilización de arginina	Producción de acetoina	Reducción de nitratos	Hidrólisis de esculina	Resistencia a la novobiocina ^a	Resistencia a la polimixina B	D-Trealosa	D-Manitol	D-Manosa	D-Turanosa	D-Xilosa	D-Celobiosa	Maltosa	α - Lactosa	Sacarosa	Rafinosa
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	-	ND	-	-	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-	+	-	+	-
<i>S. epidermidis</i>	-	d	+	+	-	-	+	-	-	(+)	(d)	-	-	+	d	+	-
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	-	d	d	d	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	(+)	-
<i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	-	+	d	+	-	-	ND	-	+	+	-	-	-	+	(d)	+	-
<i>S. caprae</i>	-	+	-	+	-	-	-	(+)	d	+	-	-	-	(d)	+	-	-
<i>S. saccharolyticus</i>	ND	d	+	+	ND	-	ND	-	-	(+)	ND	-	-	-	-	-	-
<i>S. warreni</i>	d	d	ND	d	-	-	-	+	d	-	(d)	-	-	(+)	d	+	-
<i>S. haemolyticus</i>	d	+	+	+	-	-	-	+	d	-	(d)	-	-	+	d	+	-
<i>S. hominis</i>	-	d	+	d	-	-	-	d	-	-	+	-	-	+	d	(+)	-
<i>S. lugdunensis</i>	-	-	d	+	-	-	-	d	+	-	+	(d)	-	-	+	+	-
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	-	+	+	+	-	-	-	d	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. auricularis</i>	-	d	+	(d)	-	-	-	(+)	-	-	(d)	-	-	(+)	-	d	-
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	d	-	+	-	-	+	d	+	-
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	-	-	+	-	-	+	-	+	d	(d)	-	-	-	(d)	-	-	-
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	+	-	d	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	(+)	+	-	-
<i>S. xylosum</i>	+	-	d	d	d	+	-	+	+	+	d	+	-	+	d	+	-
<i>S. kloosii</i>	d	-	d	-	d	+	-	+	+	-	-	(d)	-	-	d	(d)	(+/-)
<i>S. equorum</i>	+	-	d	+	d	+	ND	+	+	+	d	+	(d)	d	d	+	-
<i>S. arlettae</i>	+	-	-	-	-	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. gallinarum</i>	d	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+
<i>S. simulans</i>	d	+	-	+	-	-	-	d	+	d	-	-	-	(+/-)	+	+	-
<i>S. carnosus</i>	-	+	d	+	-	-	-	d	+	+	-	-	-	-	d	-	-
<i>S. intermedius</i>	-	d	+	+	-	-	-	+	(d)	+	d	-	-	(+/-)	d	+	-
<i>S. delphini</i>	ND	+	-	+	ND	-	ND	-	(+)	+	ND	-	ND	+	+	+	ND
<i>S. hyicus</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>S. chromogenes</i>	-	+	-	+	-	-	+	+	d	+	d	-	-	d	+	+	-
<i>S. caseolyticus</i>	-	d	-	+	ND	-	-	d	-	-	-	-	-	+	+	d	ND
<i>S. sciuri</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	+	(d)	(+/-)	(d)	+	(d)	(d)	+	-
<i>S. lentus</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	+	(+)	(+/-)	(+/-)	+	d	d	+	+

Símbolos: +, 90% o más de los cultivos dan reacción positiva; +/-, 90% o más de los cultivos dan reacción positiva retardada; -, 90% o más de los cultivos dan reacción negativa; d, del 11 al 89% de los cultivos dan reacción positiva; ND, no determinada; () reacción retardada.

^a Se considera positiva si se observa una zona de inhibición con un diámetro menor o igual a 16 mm empleando discos de Novobiocina de 5 µg.

Fuente: Albert Balows, *Manual of Clinical Microbiology*, 1991

Es importante mencionar que dentro de la especie *S. epidermidis* se encuentran cuatro biotipos cuyas características diferenciales se mencionan en seguida:

Tabla 2
Características bioquímicas de los biotipos de *S. epidermidis*

Prueba	Biotipo			
	1	2	3	4
Voges-Proskauer	+	-	+	+
Fosfatasa	+	+	-	-
Formación de ácido (aeróbico) a partir de:				
Lactosa	+	d	-	d
Maltosa	+	-	d	d
Manitol	-	-	-	+

Símbolos: +, 90% o más de los cultivos, dan reacción positiva, -, 90% o más de los cultivos, dan reacción negativa, d, menor al 90% de los cultivos dan reacción negativo

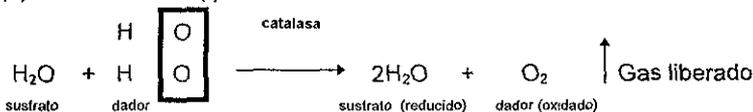
Fuente: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 8a edición

Pruebas de identificación

Como se puede apreciar en las tablas que anteriormente se mostraron, existe una gran variedad de pruebas para la identificación de especie de los microorganismos pertenecientes al género *Staphylococcus*. Sin embargo, dado que los fundamentos de cada una de las pruebas no es importante para el propósito de esta tesis, solo se mencionan aquellos que se consideran más importantes para el proceso de identificación y certificación, así como algunas adicionales.

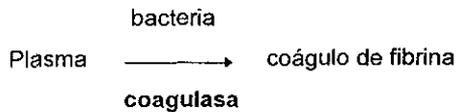
Prueba de la catalasa

La catalasa es una enzima que descompone al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. El peróxido de hidrógeno es uno de los productos oxidativos finales en el metabolismo aerobio de los carbohidratos, si se acumula es letal para las células bacterianas. Exceptuando a los estreptococos y a *Gardennella vaginalis*, las bacterias aerobias y facultativas poseen esta enzima, no así la mayoría de las anaerobias que, con el objeto de llevar a cabo la degradación del mismo sustrato, producen la peroxidasa. De esta manera, esta prueba se utiliza generalmente para diferenciar al género *Streptococcus*(-) del *Staphylococcus* y *Micrococcus* (+), o para diferenciar al género *Bacillus* (+) del *Clostridium* (-).^{23, 38}



Prueba de la coagulasa

La coagulasa es una enzima relativamente termoestable, ya que resiste temperaturas de hasta 60°C durante 30 min. La coagulasa es una proteína de composición química desconocida, con actividad semejante a la protrombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, produciendo un coágulo visible en un sistema de prueba apropiado. Esta prueba comprueba la facultad del microorganismo de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa. Además se emplea para diferenciar *Staphylococcus aureus* (coagulasa positiva) de los otros estafilococos.^{23, 21}



Prueba de la oxidasa

Esta prueba también conocida como prueba de la citocromo oxidasa (ectoenzima), consiste en detectar si el microorganismos analizado posee un citocromo oxidasa capaz de oxidar compuestos aminados tales como el clorhidrato de N,N-dimetil p-fenilendiamina y la forma tetrametilada del mismo compuesto. La acción de dicha enzima se detecta cuando al contacto con tales compuestos, genera un color marrón que después se torna negro.²⁶

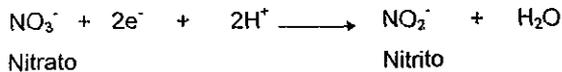
DNasa

Otra forma de clasificar los estafilococos dentro de la especie *S. aureus*, esta basado en la detección de enzima capaces de degradar el DNA. La producción de esta enzima se puede determinar mediante la incorporación de ácido desoxiribonucleico (DNA) en agar nutriente, esto es, al incorporar azul de toluidina como indicador al medio de cultivo, la producción de enzimas cambia el color del medio, de azul a rosa, de tal manera que se puede determinar si el microorganismo es productor de DNasa o no, según el vire.^{23, 22}

Reacción de la ureasa

El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico, a la que frecuentemente se menciona como carbamida. La hidrólisis de la urea es catalizada por la enzima ureasa, la cual es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos. La ureasa es considerada una enzima constitutiva dado que es sintetizada por ciertas bacterias sin tener en cuenta la presencia o ausencia de su

A través de esta prueba se determina si el microorganismo es capaz de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre.²⁶



Voges Proskauer (VP)

La reacción VP determina la capacidad de algunos microorganismos de producir un producto final neutro el acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa. Esta es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave en la glucólisis. A partir del ácido pirúvico, una bacteria puede seguir muchas vías. La producción de acetoína es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias.²⁶

Utilización de carbohidratos

Esta prueba determina la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido o ácido con gas visible. La fermentación es un proceso metabólico de oxidación-reducción anaeróbico en el cual un sustrato orgánico sirve como el aceptor de hidrógeno final (aceptor de electrones) en lugar del oxígeno. La fermentación de sustratos orgánicos como los carbohidratos dan tanto productos finales reducidos como oxidados. El tipo de productos finales producidos por la fermentación de los hidratos de carbono depende de varios factores: 1) el tipo de organismo que lleva a cabo el proceso de fermentación, 2) la naturaleza del sustrato que debe ser fermentado, y 3) a veces, los factores ambientales como la temperatura y la acidez. Los productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono y los alcoholes denominados colectivamente "azúcares", son pocos: dos gases, hidrógeno y anhídrido carbónico, algunos pocos ácidos; algunos alcoholes y una cetona. Existen distintas clases de fermentación producida por las bacterias, y cada una depende de los productos finales característicos formados. En general los grupos más importantes de bacterias muestran uno de los cinco tipos principales de formas de fermentación: fermentación alcohólica, fermentación del ácido láctico, fermentación del ácido propiónico, fermentación del grupo coliforme y fermentación del alcohol butílico.¹⁷

26

Producción de hemolisinas

El principio de esta prueba radica en que si la cepa produce hemolisinas, éstas lisan los eritrocitos circundantes dando origen a una zona de aclaramiento alrededor de las colonias. En ciertos casos las cepas son productoras de beta hemolisinas, por lo

que la zona de aclaramiento abarca desde la superficie del agar hasta el fondo de la placa.^{21, 22}

Resistencia a la novobiocina

Esta prueba esta basada en la capacidad del microorganismo a resistir a la acción de la novobiocina, es decir, que en presencia de dicho antibiótico se ve inhibido su crecimiento. El *S. saprophyticus* es actualmente la única especie del género *Staphylococcus* resistente a la novobiocina.^{22, 30}

1.7.2 *Streptococcus*

El género *Streptococcus* pertenece a la familia *Streptococcaceae* y sus especies principales son las siguientes: *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. equisimilis*, *S. canis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. pneumoniae*, *S. bovis* y *S. faecalis*. Estas dos últimas actualmente han sido incluídas en el género *Enterococcus*, del cual hasta la fecha se conocen 12 especies.^{30, 17}

El papel de los estreptococos en la enfermedad humana se apreció muy pronto, dado que la gran mayoría de sus especies ocasionan enfermedades muy diversas en el humano: faringoamigdalitis, sinusitis, otitis, caries, oftalmías, piodermitis, septicemia, meningitis, artritis, bronquitis, neumonía, etc. (Tabla 4).^{9, 10}

La diferenciación de las especies dentro del género es complicada, debido a que se emplean por lo menos cuatro esquemas distintos para la clasificación de estos microorganismos:

- 1) Presentación clínica: estreptococos piogénicos, orales, entéricos, esto indica, que se clasifican en base al sitio anatómico en el que se encuentren, y al patrón de hemólisis que presenten.¹⁴
- 2) Propiedades serológicas: grupo de Lancefield de la A a la H y de la K a la V. Rebeca Lancefield diseño la forma más confiable de dividir a los estreptococos, de acuerdo a las características serológicas de cada carbohidrato C, presente en cada estreptococo (Tabla 3).^{14, 23, 9}
- 3) Patrones de hemólisis o clasificación de Brown: este autor encontró que los estreptococos pueden subdividirse en tres clases dependiendo del tipo de hemólisis que producen en placas de agar sangre. Estos son: hemólisis completa [beta] en la que el estreptococo sintetiza tanto la estreptolisina S

como la O, de tal manera que destruyen los eritrocitos que circundan las colonias, desde la superficie del agar hasta la parte profunda de la placa, incompleta [alfa] en la cual solo hay síntesis de estreptolisina S, provocando sólo la destrucción de los glóbulos rojos que rodean a las colonias, únicamente en la parte superficial del agar. y nula [gama] en la que no existe síntesis de estreptolisinas y por tanto no se produce hemólisis alguna (Tabla 3).^{23, 9, 10}

- 4) Propiedades bioquímicas: éstas incluyen fermentación de carbohidratos, presencia de enzimas y susceptibilidad o resistencia a ciertos agentes químicos..^{23, 9}

Además de las clasificaciones anteriores, Sherman introdujo una nueva clasificación, que divide a los estreptococos en cinco grupos:

a) piogénico: integrado por estreptococos beta-hemolíticos, no todos pertenecen al grupo A, sino que miembros de otros grupos como B, C, G y F que también son beta-hemolíticos,

b) láctico: no tiene importancia médica ya que sus miembros se desarrollan en productos lácticos y son saprófitos,

c) enterococo *S. faecalis* y sus variedades, *S. zymogenes*, *S. liquefaciens*, *S. faecium* y *S. durans*, pertenecen al grupo D de Lancefield. En agar sangre presentan hemólisis de diferentes tipos: alfa, beta o gama, además de ser considerados residentes normales del intestino y resistentes a concentraciones del 6.5% de cloruro de sodio.

d) viridans. grupo integrado por las especies que tienen la propiedad de producir hemólisis alfa, aunque también existen cepas no hemolíticas y algunas beta hemolíticas. Este grupo está presente en la cavidad oral y tiene como representante a *S. salivarius* y otras como *S. mitis*.

e) neumococo: grupo de estreptococos alfa-hemolítico, encapsulados; forman parte de la flora normal y patológica de la cavidad orofaríngea.

f) peptoestreptococo. en este grupo se incluyen los cocos anaerobios y varios estreptococos que crecen en ambientes con tensión reducida de oxígeno (microaerofílicos).¹⁴

Tabla 3

Clasificaciones más utilizadas para el Género *Streptococcus*

Clasificación de Lancefield	Clasificación bioquímica	Patrones de hemólisis	Clasificación de Lancefield	Clasificación bioquímica	Patrones de hemólisis
A	<i>S. pyogenes</i>	beta.	F	<i>S. anginosus</i>	beta
B	<i>S. agalactiae</i>	beta, en ocasiones alfa o no hemólisis	G	<i>S. anginosus</i>	beta
C	<i>S. equi</i> <i>S. equisimilis</i> <i>S. dysgalactiae</i>	beta, en ocasiones hemólisis alfa o no hemólisis.	H	<i>S. sanguis</i>	alfa
D	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. durans</i> No enterococos <i>S. bovis</i> <i>S. equinus</i>	alfa, no hemólisis, en ocasiones beta.	K	<i>S. salivarius</i>	alfa
F	<i>S. anginosus</i>	beta	N	<i>S. cremoris</i> <i>S. lactis</i>	
G	<i>S. anginosus</i>	beta	ninguno	<i>S. pneumoniae</i>	alfa
H	<i>S. sanguis</i>	alfa	Grupo viridans	<i>S. adjacens</i> <i>S. anginosus</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. defectivus</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. vestibularis</i> .	Alfa, no hemólisis

Fuente. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 8ª. Edición y Patrick R. Murray, *Microbiología Médica*

Tabla 4

Enfermedades más comunes provocadas por el género *Streptococcus*

Microorganismo	Enfermedad
<i>S. pneumoniae</i>	Neumonía, sinusitis, otitis media, meningitis, bacteremia.
<i>S. pyogenes</i> (grupo A)	Faringitis, escarlatina, síndrome del shock tóxico estreptocócico, erisipela, fiebre reumática, glomerulonefritis.
<i>S. agalactiae</i> (grupo B)	Infecciones neonatales (meningitis, neumonía, bacteremia), sepsis postparto.
Grupo <i>S. intermedius</i> , <i>S. anginosus</i> (<i>S. milleri</i>)	Bacteremia, formación de abscesos
Grupo viridans	Bacteremia, endocarditis, caries dentales.

Fuente. Patrick R. Murray, *Microbiología Médica*

El habitat normal de los estreptococos lo constituyen el hombre y los animales. En estos últimos se reconocen varias especies como *S. agalactiae* y *S. equi*. No obstante, los estreptococos de origen animal en ocasiones pueden originar infecciones en el hombre, esto ocurre a través de gotitas de flügge o exudados que contengan estreptococos.^{9, 10}

Características microscópicas

El género *Streptococcus* abarca una colección diversa de especies de cocos gram positivos, cuyo diámetro varía entre 0.5 y 1 μ , muchas veces dispuestos en parejas o en cadenas. No móviles o raramente móviles, no forman endoesporas, y en su mayoría presentan cápsulas muy evidentes.^{17, 30}

Características macroscópicas

Forman colonias pequeñas de aprox. 1.5 mm de diámetro, translúcidas, grisáceas, convexas, de bordes regulares y, según la generalidad de los autores, semejan pequeñas gotas de rocío. Cabe mencionar que se han encontrado pigmentos rojos o amarillos en algunos cultivos de los grupos B y D. Su crecimiento en agar sangre permite identificar el tipo de hemólisis que producen, las cuales ya fueron mencionadas en la parte de clasificaciones. Además en este mismo medio se pueden presentar tres tipos de colonias: mucoides, mate y lustrosas. Las primeras contienen gran cantidad de material capsular formado principalmente por ácido hialurónico altamente higroscópico, lo que da a la colonia un aspecto húmedo, brillante y suave. Las colonias mate tienen apariencia opaca y rugosa, esto debido a la cantidad de humedad del medio de cultivo y de la carencia de cápsula. Las colonias lustrosas suelen ser más pequeñas, lisas y brillantes.^{17, 9, 10, 23}

Características bioquímicas

Son quimiorganotróficos y fermentan los hidratos de carbono con producción de ácido láctico, son organismos catalasa negativos, resistentes a la bencidina y oxidasa negativos. El % de G + C en el DNA es de 32 - 42 moles. Los enterococos y los estreptococos presentan una estructura antigénica definida: su pared celular se encuentra constituida por tres capas, la más interna corresponde a un mucopéptido bacteriano clásico, la intermedia es conocida como carbohidrato C y su composición química se considera específica de grupo y la más externa esta conformada por proteínas M, T y R, las cuales determinan el serotipo de cada cepa.^{17, 14}

Toxinas y enzimas

Estreptocinasa: enzima que provoca la transformación del plasminógeno del suero humano en plasmina (enzima proteolítica activa que digiere a la fibrina y otras proteínas). Es producida por muchas cepas de estreptococo beta-hemolítico.

Estreptodornasas o desoxirribonucleasas estreptocócicas A,B,C y D: son enzimas estreptocócicas antigénicamente diferentes que participan en la degradación del DNA.

Hialuronidasa: enzima que hidroliza el ácido hialurónico, constituyente importante de la sustancia intercelular del tejido conjuntivo, así pues, la hialuronidasa favorece la diseminación de los microorganismos infectantes.

Toxina eritrógena: toxina que provoca el exantema que se presenta en la escarlatina, es elaborada solamente por estreptococos lisógenos.

Difosfopiridina nucleotidasa: sustancia que se ha relacionado con la capacidad del microorganismo para destruir leucocitos.

Hemolisinas: muchos estreptococos son capaces de lisis a los eritrocitos in vitro en diverso grado. Los estreptococos beta-hemolíticos del grupo A producen dos hemolisinas (estreptolisinas):

La estreptolisina O es una proteína (peso molecular 60,000) con actividad hemolítica solamente cuando esta reducida (grupos -SH disponibles) y que se inactiva rápidamente cuando se oxida.

Estreptolisina S es el compuesto causante de las zonas hemolíticas alrededor de colonias estreptocócicas que proliferan en la superficie de placas de agar sangre. No es antigénica.

Nicotinadeninucleotidasa (NADasa): por su acción enzimática es leucotóxica, y estimula la producción de anticuerpos en forma tardía.

Existen además otros productos extracelulares como proteinasas, amilasas, esterases, que contribuyen a la destrucción celular en el huésped.^{30, 14, 23, 9}

Condiciones de crecimiento

La mayoría de las especies son anaerobias facultativas, aunque los requerimientos atmosféricos pueden oscilar desde especies anaerobias estrictas hasta capnofílicas (su crecimiento requiere del 5 al 10% de CO₂). Los requisitos nutricionales son complejos y resulta necesario el uso de medios enriquecidos con sangre o suero para su aislamiento. Requieren de un tiempo de incubación de 24 a 48 h., a 37°C.^{30, 10}

Cultivo y aislamiento

Dado que los estreptococos son considerados bacterias delicadas y exigentes, se requiere de medios enriquecidos, como el agar sangre, integrado por sangre de carnero. Este medio no solo favorece el aislamiento del microorganismo, sino que además, permite observar el tipo de hemólisis de la cepa en cuestión. Los medios líquidos que se pueden utilizar son el caldo infusión cerebro corazón o tripticaseína-soya u otro enriquecido.^{17,9}

Colección, transporte y almacenaje.

Muchos estreptococos sobreviven por diversos meses en tubos con agar inclinado con tapón de rosca y almacenados a 4°C. Las excepciones son los neumococos y algunos cultivos viridans, los cuales no sobreviven por más de una semana, bajo estas condiciones. Generalmente los estreptococos no sobreviven bien en medios de cultivo líquidos, y mueren después de 3 ó 4 días. Todos los estreptococos sobreviven de 1 a 2 años congelados a -70°C y por 20 años o más liofilizados. El secado en arena también es usado para almacenarlos (el neumococo no sobrevive) por 20 años o más.^{9, 10, 7}

A continuación se muestran tablas comparativas para la identificación de las especies pertenecientes a este género.

Tabla 5

Aspectos clínicos y de laboratorio del Género *Streptococcus* según clasificación de Lancefield

Grupos de Lancefield	Habitat humano normal	Pruebas de laboratorio utilizadas en la identificación
A	Faringe, piel.	Agrupamiento de Lancefield. Disco de bacitracina A Anticuerpos fluorescentes. Aglutinación al látex.
B	Faringe, vagina, heces En neonatos, vanas localizaciones.	Hidrólisis de hipurato Prueba de CAMP Bilis-esculina Aglutinación al látex
C	Faringe, vagina, piel.	Falta de crecimiento a 10°C, 45°C Hidrólisis de hipurato Fermentación de glicerol, trealosa, sorbitol. Aglutinación al látex.
D	Intestino grueso.	Hidrólisis de bilis-esculina Tolerancia a 6.5% de NaCl Aglutinación al látex
F	Boca, dientes, faringe	Producción de ácido a partir de glucosa, maltosa, salicina y sacarosa. No ácido a partir de inulina, xilosa, arabinosa y manitol. Aglutinación al látex.
G	Faringe, vagina, piel.	Amoniaco a partir de arginina Fermentación de la inulina Aglutinación al látex
H	Boca, dientes, faringe.	Fermentación de la inulina Producción de polisacárido viscoso en caldo de sacarosa al 5%
K	Faringe, boca.	Acido a partir de glucosa, sacarosa y maltosa No ácido a partir de glicerol, manitol y sorbitol
Ninguno	Faringe, boca, tráquea	Serotipificación Solubilidad en bilis Susceptibilidad a la optoquina

Nota grupo C el *S. dysgalactiae* no hidroliza el hipurato Fermenta trealosa, a veces el sorbitol, pero no el glicerol.
Fuente: Elmer W. Koneman, *Diagnóstico Microbiológico*

Tabla 6

Identificación bioquímica presuntiva del Género *Streptococcus*

Grupos	Pruebas								
	Hemólisis	Susceptibilidad a:		Hidrólisis de:					
		Bacitracina	SXT	Hipurato	PYR	CAMP	Bilis-esculina	Crecimiento en 6.5% de NaCl	Optoquina y bilis***
Grupo A	beta	+	-	-	+	-	-	-	-
Grupo B	beta	-*	-	+	-	+	-	++	-
Otros estreptococos beta-hemolíticos**	beta	-*	+	-	-	+	-	-	-
Grupo D, enterococos	alfa, beta, ninguna	-	-	-*	+	-	+	+	-
Grupo D, no enterococos	alfa, ninguna	-	++	-	-	-	+	-	-
Grupo viridans	alfa, ninguna	-*	+	-*	-	-	-*	-	-
Neumococos	alfa	-	?	-	-	-	-	-	+

Símbolos : +, reacción positiva o susceptible; -, reacción negativa o resistente; *, ocurren ocasionalmente, ?, no determinada.

SXT, Sulfametoxazol y trimetoprim. PYR, L-pirrodilonil-beta-naftilamina.

** No grupos A, B o D.

*** Susceptibilidad a la optoquina y solubilidad en bilis.

Fuente: Edwin H. Lennette, *Manual of Clinical Microbiology*.

Tabla 7
Diferenciación bioquímica de *Streptococcus* del grupo D y grupo viridans

Especies	Hemólisis				Pruebas fisiológicas															
	alfa	beta	gamma	Bilis-esculina	Creclimiento en 6.5 de NaCl	Creclimiento a 10°C	Piturato	Arginina	Esculina	Almidón	Hipurato	Sacarosa	Lactosa	Manitol	Sorbitol	Arabinosa	Sorbose	Inulina	Rafinosa	Glucano
<i>S. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	V	+	+	+	+	-	-	-	-	N
<i>S. faecium</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	V	+	+	+	+	+	-	-	+	N
<i>S. avium</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	N
<i>S. durans</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	V	+	+	+	+	+	-	-	+	N
<i>S. bovis</i>	-*	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	L
<i>S. mutans</i>	-*	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	D
<i>S. uberis</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	N
<i>S. intermedius</i>	-*	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	V	N*
<i>S. bovis (var.)</i>	-*	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	V	N*
<i>S. constellatus</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	N
<i>S. equinus</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	N
<i>S. sanguis I</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	D*
<i>S. salivarius</i>	-*	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	L*
<i>S. mitis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	N
<i>S. sanguis II</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	D*
<i>S. morbillorum</i>	-*	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	N

Simbolos : +, reacción positiva; -, reacción negativa; V, reacción variable; *, ocurre en algunas excepciones. Para glucanos : D, dextrana; L, levanas; N, no glucanos.

Fuente: Edwin H. Lennete, *Manual of Clinical Microbiology*.

Tabla 8
Diferenciación bioquímica de las especies restantes del Género *Streptococcus*

PRUEBA	Glucosa	Maltosa	Salicin	Sacarosa	Lactosa	Trealosa	Inulina	Xilosa	Arabinosa	Glicerol	Manitol	Sorbitol	Rafinosa	Arginina	Gelatina	Almidón	Hipurato	Esculina
<i>S. lactis</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	d	d
<i>S. cremoris</i>	+	d	d	d	+	d	-	-	-	-	d	-	d	-	-	-	-	d
<i>S. sanguis</i>	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>S. anginosus</i>	+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+
<i>S. acidominimus</i>	+	+	d	+	+	+	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	(+)	-
<i>S. termophilus</i>	+	-	-	+	+	-	-	d	d	-	-	d	-	-	-	-	-	-
<i>S. zooepidemicus</i>	+	d	+	+	d	-	-	-	-	-	-	+	-	d	d	d	d	d
<i>S. equi</i>	+	+	+	+	-	-	-	d	-	-	-	-	-	d	d	d	d	d
<i>S. dysgalactiae</i>	+	+	d	+	d	+	-	d	d	-	-	d	-	d	d	d	d	d
<i>S. agalactiae</i>	+	+	+	d	+	+	-	-	-	+	-	-	-	d	d	d	d	dd

Simbolos: +, reacción positiva; -, reacción negativa; d, ocurre ocasionalmente; (), reacción tardía.

* en condiciones aerobias. ** positivo en cultivos aislados de ganado bovino.

Fuente: *Bergey's Manual of Bacteriology*, 8ª. ed., y Elmer W., Koneman, *Diagnóstico Microbiológico*

Streptococcus pneumoniae

A pesar de que esta especie comparte bastantes características con las mencionadas para el resto de los estreptococos, muestra ciertas diferencias, que se consideran básicas para su identificación, por ello se menciona como una entidad aparte.

Características microscópicas

El neumococo es un coco grampositivo encapsulado. Las células miden de 0.5 a 1.2 μ de diámetro, tienen forma oval o lanceolada y se disponen en parejas o cadenas cortas. Los cultivos más antiguos pueden decolorarse con facilidad y aparecen gram negativos.^{30, 14}

Características macroscópicas

La morfología de sus colonias varía: las cepas capsuladas forman en general colonias grandes (1 a 3 mm sobre agar sangre, más pequeñas en agar chocolate), redondas, mucoides y no pigmentadas. Las cepas virulentas de *S. pneumoniae* están cubiertas por una cápsula polisacárida compleja. Las cepas no capsuladas son más pequeñas y aparecen planas. Todas las colonias experimentan autólisis al envejecer (la porción central de la colonia se disuelve, lo que produce un aspecto umbilicado). Las colonias son alfa-hemolíticas en agar sangre cuando se incuban bajo condiciones aerobias y pueden ser beta-hemolíticas en los cultivos anaerobios.^{17, 30, 23}

Características bioquímicas

S. pneumoniae fermenta varios hidratos de carbono y el producto metabólico principal es el ácido láctico. Como todos los estreptococos, *S. pneumoniae* carece de catalasa.¹⁷

Las cepas capsuladas poseen polisacáridos capsulares distintos desde el punto de vista antigénico y han sido empleados para la clasificación serológica de las cepas. En la actualidad se reconocen 84 serotipos. La capa de peptidoglicano de la pared celular de los neumococos es típica de los cocos gram positivos, con subunidades alternantes de N-acetilglucosamina y ácido acetilmurámico entrecruzadas mediante puentes peptídicos. El otro componente fundamental de la pared celular es el ácido teicoico, rico en galactosamina fosfato y colina. La presencia de colina es exclusiva de la pared celular de *S. pneumoniae* y ejerce un papel regulador importante en la hidrólisis de esta pared. En ausencia de colina, la enzima autolítica neumocócica es incapaz de actuar y cesa la división celular. Existen dos formas de ácido teicoico en la pared celular neumocócica: una

expuesta en la superficie celular y otra similar unida de forma covalente a los lípidos de las membranas plasmáticas.

Dentro de los factores de virulencia de *S. pneumoniae* se encuentran: cápsula, neumolisinas (hemolisina sensible a la temperatura y al oxígeno, relacionadas desde el punto de vista inmunológico con la estreptolisina O), principio productor de púrpura, neuraminidasa, y autolisinas.³⁰

Condiciones de crecimiento

El organismo tiene necesidades nutricionales delicadas y sólo es capaz de crecer en medios enriquecidos (p. ej. agar tripticaseína-soja o agar de infusión cerebro corazón) y suplementados con productos hematológicos. Esta especie crece poco en medios con concentraciones altas de glucosa, debido a que el ácido láctico alcanza con rapidez niveles tóxicos.^z

Cultivo y aislamiento

Se realiza de manera similar a lo indicado en el resto de los estreptococos.

Colección, transporte y almacenaje

Dada la elevada sensibilidad del microorganismo a las condiciones ambientales, no pueden ser almacenados a las temperaturas de refrigeración ordinarias. Generalmente se almacenan liofilizados por períodos superiores a los 5 años.^{9,10}

Pruebas bioquímicas

A continuación se menciona el fundamento de las pruebas bioquímicas principales para la identificación de especie de los estreptococos

Patrón de hemólisis

Basada en la clasificación de Brown, se determina el tipo de hemólisis del microorganismo:

- 1) Hemólisis alfa que produce una decoloración verdosa y hemólisis parcial de los glóbulos rojos que rodean a la colonia, detectada por una zona de aclaramiento alrededor de las colonias.
- 2) Hemólisis beta, que produce una zona clara de hemólisis alrededor de la colonia, la hemólisis es producida desde la superficie del agar hasta la parte profunda de la placa.
- 3) Hemólisis gama, en la que no se ven afectados los glóbulos rojos del medio, es decir no existe hemólisis.^{23,14,38}

Sensibilidad a 0.02 - 0.04 U (mg/ml) de bacitracina

Esta prueba se emplea para diferenciar a los estreptococos del grupo A de Lancefield dado que, a esas concentraciones de dicho antibiótico, este grupo es incapaz de desarrollar. La elección de esta prueba depende de que el estreptococo en estudio haya manifestado una hemólisis tipo beta previamente.^{23, 38}

Hidrólisis del hipurato

Esta prueba se emplea para diferenciar a los estreptococos del grupo B, los cuales son los únicos microorganismos del género capaces de producir la enzima hipuricasa que puede hidrolizar el ácido hipúrico, dicha enzima esta contenida en las estrepto-beta-lisinas. Esta enzima actúa sobre el hipurato de sodio produciendo benzoato de sodio y glicina, los cuales pueden detectarse con cloruro férrico y ninhidrina, respectivamente. El cloruro férrico precipita las proteínas, el hipurato y el benzoato, sin embargo, las proteínas y el hipurato son más solubles que el benzoato en un exceso de cloruro férrico. Así la presencia de un precipitado color café en un medio líquido con hipurato después de agregar cloruro férrico en exceso indica la presencia de benzoato y una reacción positiva para la hidrólisis del hipurato. Por otro lado la ninhidrina es un fuerte agente oxidante que desamina los grupos alfa-amino con liberación de NH₃ y CO₂. El amoníaco liberado reacciona con la ninhidrina residual y produce un color púrpura, que nos indica reacción positiva^{23, 26, 38}

Prueba de CAMP

La actividad hemolítica de la beta-lisina estafilocócica sobre los eritrocitos es incrementada por un factor extracelular producido por los estreptococos del grupo B, denominado factor de CAMP. Por lo tanto, la acentuación de la reacción beta-hemolítica ocurre cuando los dos reactivos se superponen en una placa de agar-sangre de carnero.^{23, 26, 10}

Prueba de bilis-esculina

Esta prueba se basa en la capacidad de ciertas bacterias, en particular los estreptococos del grupo D, de hidrolizar la esculina en presencia de 1-4% de sales biliares (equivalente a 10-40% de bilis) Las bacterias capaces de crecer en bilis y también de hidrolizar la esculina producen glucosa y esculetina de aglucona (7,7 dihidroxicumarina) en un medio apropiado. La esculetina reacciona con las sales de hierro y forma un complejo marrón oscuro o negro, que resulta en un ennegrecimiento

difuso del medio de bilis-esculina, que contienen citrato férrico como fuente de iones férricos.^{23, 26}

Capacidad para desarrollar en presencia de 6.5% de NaCl

Esta prueba se realiza como complemento de la anterior, para diferenciar *S. faecalis* y a otras especies halófilas, de *E. bovis* y algunas otras que desarrollan en presencia de altas concentraciones de NaCl.²³

Prueba de susceptibilidad a la optoquina

El clorhidrato de etilhidroxicupreína (optoquina), un derivado de la quinina, inhibe selectivamente el crecimiento de *S. pneumoniae* en concentraciones muy bajas (5 µg/ml o menos). La optoquina puede inhibir otros estreptococos alfa-hemolíticos, pero solo con concentraciones mayores.²³

La optoquina es soluble en agua y difunde con rapidez en el medio de agar. Por lo tanto, los discos de papel de filtro impregnados con optoquina pueden colocarse directamente sobre la superficie de agar al realizar la prueba. Las células de *S. pneumoniae* alrededor del disco son lisadas debido a cambios en la tensión superficial, y se produce una zona de inhibición del crecimiento.^{26, 38}

Utilización de carbohidratos

Es el mismo fundamento que el indicado para el género *Staphylococcus*.¹⁷

Reacción con antisueros.

La técnica a seguir depende del tipo de Kit con el que se cuente, pero el principio de la prueba es igual para todos. Para este estudio se utilizará el Kit Pastorex STREP de SANOFI. La reacción con antisueros es una prueba de aglutinación rápida y sensible de los estreptococos β- hemolíticos pertenecientes a los principales grupos de Lancefield. Consta de suspensiones de látex que permiten identificar los grupos A, B, C, D, F y G. La identificación de los estreptococos β- hemolíticos en base a polisacáridos específicos de grupo, requiere previamente la extracción de estos antígenos, a partir de las colonias aisladas en primocultivo en agar-sangre. El sistema Pastorex STREP realiza ésta extracción en 15 minutos a temperatura ambiente o en 10 minutos a 37°C con una enzima activa que lisa las paredes celulares y permite la disolución del poliósido C. En presencia del antígeno, las partículas de látex cubiertas de anticuerpos homólogos se aglutinan muy rápidamente, indicando reacción positiva y por ende se identifica el grupo de Lancefield al que pertenece el microorganismo en estudio.²³

1.7.3 *Micrococcus*

En un principio los *Micrococcus* fueron considerados, dentro del grupo de los estafilococos, pero estudios recientes, basados en el análisis de la pared celular y genéticos sugieren que están más cerca de bacterias corineformes, encontradas principalmente en el suelo. Se han descrito nueve especies de micrococcos: *M. luteus*, *M. lylae*, *M. nishinomiyaensis*, *M. sedentarius*, *M. halobius*, *M. varians*, *M. roseus*, *M. agilis*, y *M. kristinae*. Como algunos de los nombres lo sugieren, algunas especies forman pigmentos durante el crecimiento; amarillo (*M. luteus*), o rojo (*M. roseus*). A menos que sean recuperados de infecciones importantes, rara vez es necesario identificar a los micrococcos a nivel de especie.^{23, 17}

Este grupo de microorganismos pueden colonizar la piel y las mucosas de humanos, pero rara vez se asocian a infecciones. Se han encontrado en abscesos de tejidos blandos, septicemia, endocarditis y meningitis. Como habitat natural primario se encuentran en la piel de mamíferos y como habitat secundario en carnes o productos lácteos, y también en aceites, agua, aire y polvo; son organismos generalmente saprófitos.^{17, 38}

Características microscópicas

Son cocos gram positivos, de 0.5-2.0 μ de diámetro, pueden estar aislados, en pares, o en forma irregular como tetradas, no móviles, no capsulados y no forman esporas.^{17, 38}

Características macroscópicas

Las colonias que forman son usualmente circulares, convexas, y lisas, y dependiendo de la especie presentan pigmentos carotenoides, que van desde el amarillo hasta el rojo.^{17, 38}

Características bioquímicas

Su metabolismo es estrictamente respiratorio, aerobios. Son catalasa positiva, oxidativos y/o fermentadores. Son susceptibles a la bacitracina, pero resistentes a la furazolidona. Metabolizan la glucosa por la vía de la hexosa monofosfato, pero no producen gas. Producen ácido a partir de una gran variedad de carbohidratos (utilizan los azúcares oxidativamente o no los utilizan en absoluto), esto varía dependiendo de la especie, no coagulan plasma y no fermentan glucosa. Todas las especies crecen en presencia de 5% de NaCl. El % de G + C en el DNA es de 66-75 moles.^{17, 38}

En lo referente a la composición de su pared celular, se han encontrado seis tipos diferentes de peptidoglicano en las diferentes especies que conforman este género: y el ácido teicoico está ausente. ¹⁷

Condiciones de crecimiento

Crece en un rango de 25 - 30°C. Sus requerimientos nutricionales son variables, sin embargo no requieren de componentes complejos para su crecimiento. Todas las especies crecen en presencia de 5% de NaCl, y solo algunas en 10 o 15%. ¹⁷

Cultivo y aislamiento

Generalmente crecen satisfactoriamente en medios mínimos como agar nutritivo, de igual manera crecen en medios enriquecidos como agar sangre. En caso de que requieran de ciertos factores de crecimiento es necesario adicionar éstos al medio de cultivo a utilizar. En el caso de contaminación con otro grupo de microorganismo se pueden emplear medios ricos en cloruro de sodio y aplicar una adecuada técnica de estría de aislamiento, para poder aislar satisfactoriamente la colonia que nos interesa. ¹⁷

38

Colección, transporte y almacenaje

Pueden ser almacenados en tubos con agar inclinado y tapón de rosca y colocados en el refrigerador a 5°C, así pueden durar de 3 a 5 meses. También pueden almacenarse en medios sólidos, a los que se le adiciona aceite mineral, así duran de 1 a 2 años y liofilizados por cerca de 5 años o más. ¹⁷

Dado que las distintas especies que conforman este género presentan similitudes en sus características morfológicas y habitat, en seguida se muestra una tabla comparativa de pruebas bioquímicas que facilitan la diferenciación y por ende identificación de dichas especies.

Tabla 9

Pruebas bioquímicas de identificación para el género *Micrococcus*

PRUEBA	<i>M. luteus</i>	<i>M. lylae</i>	<i>M. varians</i>	<i>M. roseus</i>	<i>M. agilis</i>	<i>M. kristinae</i>	<i>M. fishinomi</i> <i>vaerisii</i>	<i>M. sedentarius</i>	<i>M. haubius</i>
	A	CB	A	RP, RN	R	NC	N	CB, AM	N
Pigmento *									
Formación de ácido a partir de (aerobio) :									
Glucosa	-	-	+	+	-	+	d	-	+
Manosa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Galactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ONPG	-	-	-	-	-	-/+	-	-	+
Glicerol	-	-	-	-	+	+	-	-	ND
Hidrólisis de esculina	-	-	-	-	+	-	d	-	+
Hidrólisis de almidón	-	-	d	d	+	-	d	-	+
Hidrólisis de gelatina	+	+	+	-	+	-	+	+	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Acetofina	-	-	-	-	-	+	-	-	+
oxidasa	+	+	-	-	-	+	+	-	+
Ureasa	d	-	+	-	-	d	+	-	-
Fosfatasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemólisis	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitratos	-	-	+	+	-	-	d	-	-
Crecimiento a 37°C	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Crecimiento en AN con 7.5% de NaCl	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Crecimiento en agar nitrógeno inorgánico	+	-	-	-	-	-	-	-	ND
Crecimiento en agar Citrato de Simmons	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Movilidad	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Símbolos A, amarillo; CB, crema-blanco; RP, rojo pastel; RN, rojo-naranja; R, rojo; NP, naranja-pálido; N, naranja, AM, amarillo-mantequilla; N, no pigmentado, +, reacción positiva, -, reacción negativa; d, ocurre ocasionalmente; ND, no determinado, AN, agar nutritivo.

* Se incluye como prueba con el nombre de pigmento, sin ser propiamente una prueba, ya que solo indica el color del pigmento.

Fuente: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9ª. ed.

Pruebas bioquímicas

A este género se le practica principalmente la prueba de utilización de carbohidratos (cinco carbohidratos), cuyo fundamento ya fue descrito.

1.7.4 *Leuconostoc*

El grupo de microorganismos pertenecientes al género *Leuconostoc*, presenta una elevada importancia industrial, debido a su producción de dextranas. Las dextranas son polímeros de elevado peso molecular, con tamaño molecular, viscosidad y solubilidad variable. Además de que son ejemplos típicos de polisacáridos extracelulares producidos por bacterias. La importancia industrial de dichos compuestos radica en el gran potencial de uso en preservación de comidas, manufactura de labiales y otros cosméticos, así como su aplicación en el campo de la medicina: dextranas de elevado peso molecular, cerca de 75000, son empleadas como sustitutos de plasma, y las dextranas con peso molecular cercano a 8000 se usan como anticoagulantes, después de la previa conversión a sulfato dextranas.³³

En lo referente a la virulencia de este género, no se ha encontrado que sea patógeno a humanos, ni a plantas, ni a animales.

Las especies de este género se encuentran en plantas, leche, queso, y vinos.¹⁷

Características microscópicas

Son microorganismos gram-positivos, esféricos, agrupados en pares o en cadenas no móviles, y no forman esporas.¹⁷

Características macroscópicas

Las colonias que forman en medios sólidos son pequeñas generalmente menor a 1 mm de diámetro, lisas y de color blanco grisáceo.

Características bioquímicas

Anaerobios facultativos. Catalasa negativos. No hidrolizan la arginina, y son no proteolíticos. No reducen nitratos ni producen indol. No hemolíticos.

La composición de su pared celular es de peptidoglucano, con alanina, serina, y lisina. El % mol de G + C en el DNA es de 38 a 44.

Condiciones de crecimiento

Crecen en un rango de temperatura de 20 a 30°C. Requieren de medios enriquecidos con factores de crecimiento como aminoácidos. Todas las especies requieren de ácido nicotínico + tiamina + biotina y otros de ácido pantotéico o derivados de éste. Algunos otros cultivos requieren de cobalamina o ácido p-aminobenzoico.

Cultivo y aislamiento

Crecen satisfactoriamente en agar nutritivo, aunque para lograr un mejor aislamiento se puede emplear el medio de agar nutritivo + 10% de glucosa, que además pone de manifiesto su capacidad de formación de dextranas. También se pueden emplear medios adicionados con un factor de crecimiento específico para este género

Colección, transporte y almacenaje

Todas las especies pueden ser preservadas por liofilización en suero de caballo + 7.5% de glucosa. Las especies no acidofílicas pueden ser almacenadas de 3 a 4 meses en leche litmus + 0.3% de levadura + 1% de glucosa y 1% de Ca₂CO₃. Previo al almacenaje es necesario incubar los cultivos de 18 a 24 o 48 h. a 30°C. *L. oenos* puede ser almacenado en tubos con agar jugo de tomate.¹⁷

Debido a que las características morfológicas entre cada especie no difieren de las mencionadas anteriormente, su diferenciación se basará en los siguientes cuadros comparativos, que agrupan una gran cantidad de pruebas bioquímicas que facilitan el proceso de identificación de cada una de las especies, pertenecientes a este género

Tabla 10
Características bioquímicas diferenciales de las especies del Género *Leuconostoc*

Característica	1 - <i>L. mesenteroides</i> , subsp.			2 - <i>L.</i>	3 - <i>L. lactis</i>	4 - <i>L.</i>
	1a <i>mesenteroides</i>	1b. <i>dextranum</i>	1c. <i>cremoris</i>	<i>paramesenteroides</i>		<i>oenos</i>
Formación de ácido a partir de:						
Arabinosa	+	-	-	d	-	d
Celulosa	d	d	-	(d)	-	d
Fructosa	+	+	-	+	+	+
Sacarosa	+	+	-	+	+	-
Trealosa	+	+	-	+	-	+
Hidrólisis de esculina	d	d	-	d	-	+
Formación de dextrana	+	+	-	-	-	-
Crecimiento a pH de 4.8	-	-	-	d	-	+
Requerimientos de TJF	-	-	-	-	-	d
Crecimiento en 10% de etanol	-	-	-	-	-	+
Presencia de NAD-dependiente de G-6-PDH	+	+	+	+	+	-

Símbolos: TJF : glucopantotenato (factor jugo de tomate); +, reacción positiva, -, reacción negativa,, d, ocurre ocasionalmente, (,), reacción retardada. Fuente: *Bergey's Manual of Bacteriology*, 9ª ed

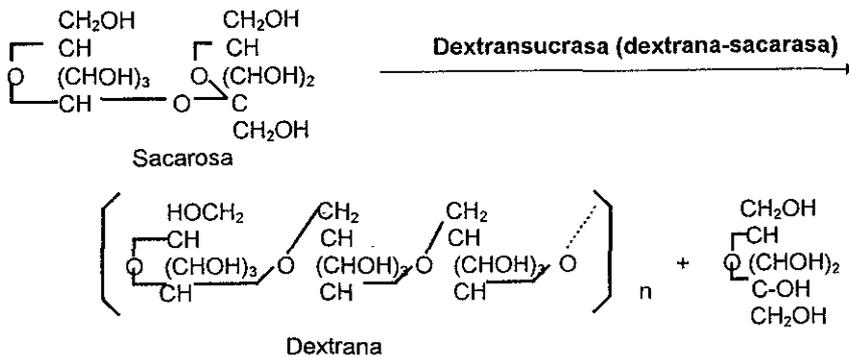
Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas primordiales de este género son:

Utilización de carbohidratos, cuyo principio ya ha sido descrito.

Formación de dextranas

Las dextranas son estructuras constituidas por cinco unidades de glucosa (pentagluco-piranosas), una cadena lateral y cuatro en lineal. No se sabe exactamente cuál es el mecanismo de la producción de dextrana a partir de sacarosa, pero se ha sugerido que ocurre una sustitución glucosídica 1,6 en la unión glucosa-fructosa de la sacarosa. Desde luego se trata de una *polimerización de la sacarosa a dextrana por la enzima dextrano-sacarasa*. Dicha acción enzimática ocurre cuando el microorganismo que posee dicha enzima se encuentra en un medio de cultivo que contiene 10% de sacarosa. La detección de dextranas se realiza al observar un crecimiento viscoso del microorganismo sobre la superficie del agar.³³



2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Material

2.1.1 *Material de laboratorio*

Material de vidrio (Pyrex)

Agujas para tráquea (Hipodermex)

Ampolletas (vidrio Duran, tubo de 8 mm de diámetro externo con 1 mm de pared)

Cajas Petri de vidrio (Pyrex)

Desecador (Pyrex)

Etiquetas (TESA No. 6 13 19 y No. 6 00 09)

Frasco ámbar de 500 ml (KIMAX)

Frascos para liofilizadora de 250 ml (LABCONCO y Pyrex)

Papel filtro Whatman No. 2

Polipapel (Bago Bag S.A. de C.V.)

Termómetro (Brannan)

Viales de baquelita con tapón de rosa (El Crisol)

2.1.2 *Equipo*

Araña o Multiconector para sellado (Equipo diseñado)

Autoclave vertical blanca (Aparatos Científicos)

Balanza analítica (*Analytical Plus* OHAUS)

Balanza digital (*Portable Advanced* OHAUS)

Bomba de vacío (Feli-Welch Mod. FE 1402)

Campanas de Flujo laminar (VECO)

Centrífuga (SOL-BAT Mod. J-12)

Computadora (Digital *Venturis 466*)

Congelador (REVCO)

Discos de Bacitracina (9.94 U) (Tipibact A. Sanofi Diagnostics Pasteur)

Discos de Optoquina (Cloruro de etilhidrocupreína 5 mcg.) (Tipibact PN. Sanofi Diagnostics Pasteur)

Discos de Novobiocina (5 mcg) (Tipibact Sanofi Diagnostics Pasteur)

Equipo para hielo (Cornelius Commercial Ice System)
Horno de microondas (PANASONIC)
Horno (Robertshaw Controls Company)
Impresora (Hewlett Packard *Laser Jet 4L*)
Incubadora de 37°C (RIOSSA)
Incubadora de 28°C (RIOSSA)
Kit de antisueros (Pastorex, Strep. Sanofi Diagnostics Pasteur)
Lámpara de luz UV (Conductores eléctricos RONAHE)
Liofilizadora (LABCONCO *Freeze - Dryer 3*)
Microscopio Zeiss (Industrias Carl Zeiss S.A. de C.V.)
Parrillas con calor y agitación (NUOVA II) .
Potenciómetro digital portátil (Conductronic S.A Mod. 10)
Refrigerador (AMERICAN)
Soplete (AGA)
Tanque de oxígeno (AGA)
Vortex (Super-Mixer, Cat. No 1290, Lab-Line Instruments, Inc.)

2.1.3 Material Biológico

Cepas empleadas

CEPA	TOTAL	PROCEDENCIA
<i>S. aureus</i>	15	Cepario. Facultad de Química
<i>S. aureus</i>	2	INER
<i>S. aureus</i>	1	INNSZ
<i>S. auriculans</i>	2	INP
<i>S. epidermidis</i>	5	Cepario. Facultad de Química
<i>S. epidermidis</i>	2	INER
<i>S. hominis</i>	3	INP
<i>S. lugdunensis</i>	1	INP
<i>S. saprophyticus</i>	1	INP
<i>S. agalactiae</i>	5	Cepario. Facultad de Química
<i>S. agalactiae</i>	5	INNSZ
<i>S. cremoris</i>	2	Cepario. Facultad de Química
<i>S. durans</i>	1	Cepario. Facultad de Química
<i>S. equi</i>	1	Cepario. Facultad de Química
<i>S. faecalis</i>	5	Cepario. Facultad de Química
<i>S. faecium</i>	1	Cepario. Facultad de Química
<i>S. lactis</i>	1	Cepario. Facultad de Química
<i>S. pneumoniae</i>	1	Cepario. Facultad de Química
<i>S. pneumoniae</i>	1	INNSZ
<i>S. pyogenes</i>	3	Cepario. Facultad de Química
<i>S. pyogenes</i>	3	INNSZ
<i>S. gpo. viridans</i>	2	Cepario. Facultad de Química
<i>Micrococcus sp.</i>	4	Cepario. Facultad de Química
<i>Leuconostoc sp.</i>	5	Cepario. Facultad de Química
TOTAL DE CEPAS	72	

Abreviaturas:

INER · Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

INP · Instituto Nacional de Pediatría

INNSZ · Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán"

2.1.4 Medios de Cultivo

1. Arginina caldo de (BIOXON)
2. Bilis-esulina agar (BIOXON)
3. Carbohidratos medio base para (BIOXON)
4. DNasa agar (MERCK)
5. Infusión cerebro corazón agar (BIOXON)
6. Infusión cerebro corazón caldo (BIOXON)

7. MIO (BIOXON)
8. Nutritivo agar (BIOXON)
- 9 Nutritivo caldo (MERCK)
10. Rojo de Fenol y Dextrosa caldo (BIOXON)
11. Rojo de Fenol y Lactosa caldo (BIOXON)
12. Sangre base de agar (BIOXON)

2.1.5 *Reactivos*

Aceite de inmersión (Química Industrial Carmo)
Aceite mineral (Química Industrial Carmo)
Acetona (MERCK)
Acido acético (J.T. Baker)
Acido clorhídrico (MERCK)
Acido sulfanílico (J.T. Baker)
Agua destilada (Facultad de Química)
Alcohol - etílico (MERCK)
Alfa naftilamina (MERCK)
Alfa naftol (SIGMA)
(L) Arginina (DIFCO)
Azul de toluidina (MERCK)
Cloruro de calcio granulado (MERCK)
Cloruro de sodio (J.T. Baker)
Cloruro férrico (Química Barsa)
Cristal violeta (MERCK)
Dextrosa anhidra (Química Industrial Carmo)
Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (SIGMA)
Extracto de levadura (BIOXON)
Fenol (J.T. Baker)
Fosfato de potasio monobásico (J.T. Baker)
Hidróxido de potasio (MERCK)
Hipurato de sodio (SIGMA)
Lactosa (SIGMA)

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Leche descremada (DIFCO)
Maltosa Monohidratada (MERCK)
(D)Manosa (SIGMA)
Manitol (DIFCO)
Neopeptona (BIOXON)
Nitrato de potasio (Técnica Química S.A.)
Oxalato de amonio (Productos Químicos Monterrey S.A.)
Peptona de caseína (BIOXON)
Peróxido de hidrógeno (Laboratorios AZTECA)
Plasma humano (Proporcionado por el INNSZ)
Púrpura de bromocresol (MERCK)
Rojo de fenol (MERCK)
Sacarosa (J.T. Baker)
Safranina (MERCK)
Sílica gel con indicador de humedad (MERCK)
Trealosa (MERCK)
Urea (MERCK)
Yodo (Química Barsa)
Yoduro de potasio (J.T. Baker)

2.2 Métodos

La parte experimental consistió de cinco etapas:

1. Reactivación de cepas.
2. Comprobación de pureza y viabilidad
3. Identificación y certificación.
4. Preservación.
5. Control de Calidad.

2.2.1 Reactivación de cepas. (Liofilizados almacenados en ampollitas)

2.2.1.1 Se hidrató cada una de las ampollitas de las cepas pertenecientes a los géneros: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* y *Leuconostoc* presentes

en la Colección de Bacterias del Cepario de la Facultad de Química, como se indica a continuación:

- a) Se marcó el perímetro de la ampolla a la mitad del tapón de algodón, con un esmeril.
- b) Se sumergió la ampolla en solución de fenol al 5% durante 30 min. como mínimo, para eliminar microorganismos contaminantes presentes en la superficie de la ampolla. También se sumergió una pinza de disección, para con ella tomar la ampolla.
- c) Se sacó la ampolla del fenol con las pinzas y se colocó entre una compresa de gasa y algodón estéril, cuidando de no tocar la compresa por la parte que estaría en contacto con la ampolla.
- d) Se ejerció presión con los dedos sobre la parte marcada en la ampolla envuelta en la compresa y así se rompió.
- e) Con una pipeta Pasteur estéril se adicionaron 0.3 ml de caldo a la ampolla, previo flameo de la abertura de la ampolla.
- f) Se agitó (con movimientos ascendentes y descendentes) con la pipeta Pasteur hasta homogeneizar la suspensión celular.
- g) Se transfirió toda la suspensión a un tubo con el mismo medio de cultivo
- h) Se incubó el medio inoculado con el liofilizado, de 24 a 48 h., a la temperatura óptima de desarrollo del microorganismo.

Nota: Todo el procedimiento anterior se realizó bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

2.2.1.2 Se esterilizaron en autoclave los restos de la ampolla y compresa y se desinfectaron las pipetas en fenol al 5% (o alcohol al 70%) antes de lavarlas.

Una vez hidratados los cultivos se sometieron a las siguientes pruebas.

2.2.2 Comprobación de pureza y viabilidad

2.2.2.1 Después del período de incubación de los cultivos hidratados se sembraron por estrías de separación en placas de agar (agar sangre para *Staphylococcus* y *Streptococcus*, agar nutritivo para *Micrococcus* y *Leuconostoc*), sembrando una placa por microorganismo.

2.2.2.2 Se incubó a una temperatura de 35°C**, de 24 a 48 h.¹

2.2.2.3 Se verificó si había crecimiento o no, para determinar la viabilidad del cultivo, además se determinó si estaba puro o contaminado, al observar para el primer caso un solo tipo de colonias, y para el segundo diferentes.

2.2.2.4 Una vez verificado que no existía contaminación y que se había logrado un aislamiento adecuado de colonias, se tomó una asada de una de las colonias y se le sometió a tinción de Gram, para con ello completar la determinación de la pureza del cultivo. En los casos en que no se logró el aislamiento, se tomó una asada a partir del tubo del liofilizado, y se inoculó en un medio selectivo o enriquecido como agar sangre.

2.2.2.5 Se incubó a 35°C**, de 24 a 48 h.¹

2.2.2.6 Se verificó el crecimiento y morfología colonial (de acuerdo a la reportada en la bibliografía), y se sometió a las colonias aisladas a tinción de Gram, para confirmar pureza.

2.2.2.7 A las cepas procedentes de las Instituciones, se les realizó tinción de Gram, así como métodos de separación en los casos en que presentaron contaminación.

2.2.3 Identificación y Certificación

Una vez confirmado la pureza y viabilidad de los cultivos, se realizó su identificación para lo cual se tomaron en cuenta las siguientes características :

2.2.3.1 Morfología microscópica

Las características microscópicas se determinaron con base en la tinción de Gram efectuada a los cultivos. Registrándose:

- Forma y,
- Agrupación celular

2.2.3.2 Morfología macroscópica

Consistió en observar la morfología colonial, en medio sólido, tomando en cuenta los siguientes puntos:

- | | |
|-----------------|-------------|
| a) Forma. | e) Pigmento |
| b) Consistencia | f) Olor |

¹ Las temperaturas de incubación que se utilizaron dependieron del género: para *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Streptococcus* a 35°C, y para *Leuconostoc* a 28°C.

- c) Elevación
- d) Superficie

- g) Opacidad
- h) Producción de hemólisis

Para observar éstas características se sembró el microorganismo puro en un medio enriquecido, como el agar sangre, y se incubó a 35°C**, de 24 o 48 horas.¹

2.2.3.3 Pruebas bioquímicas

Fueron conformadas por pruebas metabólicas y producción de enzimas intra y extracelulares como:

A) Prueba de la catalasa

Método del portaobjetos.

- Con una piseta se depositó una gota de solución salina isotónica, (SSI) en el centro de un portaobjetos
- Con el asa bacteriológica (previa esterilización) se tomó la muestra del cultivo de medio sólido, depositándola sobre la gota de SSI.
- Se mezcló perfectamente el agua con el microorganismo.
- Se adicionó una gota de H₂O₂ al 30% sobre la mezcla
- La inmediata formación de burbujas bien visibles (formación de O₂) o efervescencia, se consideró prueba positiva; si no había formación de burbujas entonces era prueba negativa.

Las pruebas anteriores se realizaron a todos los cultivos. Aquellos que resultaban catalasa positivos, se les sometió a las siguientes pruebas:

B) Prueba de la oxidasa.

Para realizarla se empleo el *método indirecto de Kovacs* sobre papel :

- Se colocó un trozo de 6 cm² de papel filtro Whatman No. 2 en la base de una caja de Petri.
- Se agregó de 2 a 3 gotas de reactivo (solución de clorhidrato de N,N-dimetil p-fenilendiamina al 1% recién preparado) en el centro del papel.
- Se hizo un extendido con el asa bacteriológica, de la colonia sospechosa, en el papel impregnado con reactivo, en forma horizontal.
- La reacción de color positiva se produce en los 5 a 10 seg., posteriores. La presencia de un color negro púrpúreo en el término de 10 seg., en el área

donde se extendió el microorganismo, se consideró prueba positiva, la reacción positiva dentro de los 10 a 60 seg., se consideró un resultado retardado; y la no producción de color en el área al cabo de 60 seg., indicó prueba negativa

C) Utilización de glucosa.

- Se utilizó como medio base el caldo rojo de fenol al cual se le adicionó glucosa (al 1%). Se inocularon 2 tubos por microorganismo a identificar o certificar, para ello se realizó antes una suspensión del microorganismo en SSI (2 ml) a partir de un cultivo puro de 24 h. y posteriormente con una pipeta Pasteur se agregaron de 1 a 2 gotas de la suspensión en cada tubo. A continuación a uno de los dos tubos se le agregó de 3 a 4 gotas de aceite mineral.
- Se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, y se realizó la lectura a las 24 h posteriores a la incubación, observándose si había o no cambio de color del indicador del medio.
- El vire de color del indicador a amarillo en ambos tubos indicó la producción de ácido fermentativamente (anaeróbicamente) y el microorganismo era un estafilococo. Si se produjo ácido únicamente en el tubo sin aceite mineral (aeróbico) (utilización oxidativa de glucosa) o si no hubo cambio en ningún tubo (no hubo utilización), el organismo era un micrococo.

A los cultivos que resultaron catalasa negativos, se les separó en *Leuconostoc* si crecían en agar nutritivo y en *Streptococcus* si no crecían en dicho medio.

Una vez identificado el género del microorganismo se les sometió a las siguientes pruebas:

Para el género *Staphylococcus*

D) Utilización de carbohidratos

- Se utilizó como medio base el caldo rojo de fenol al cual se le adicionó el carbohidrato a estudiar. Se inoculó el medio con el microorganismo a identificar, para ello se realizó antes una suspensión del microorganismo en SSI (2 ml) a partir de un cultivo puro de 24 h y posteriormente con una pipeta Pasteur se agregaron de 1 a 2 gotas de la suspensión en cada uno de los

tubos con el carbohidrato a estudiar. Los carbohidratos empleados fueron: lactosa, maltosa, manitol, manosa, sacarosa y trealosa.

- Se incubó a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, y se realizó la lectura a las 24 h. posteriores a la inoculación, observándose si había o no cambio de color del indicador del medio
- El vire de color del indicador, a amarillo reveló la producción de ácido, y por tanto prueba positiva; por el contrario el vire a rojo indicó alcalinidad y prueba negativa. Si no había cambio en el color del indicador del medio comparado con el testigo, la prueba se consideró también negativa.

E) Prueba de la coagulasa

- Para realizarla se agregaron 0.5 ml de un caldo de cultivo puro de 18-24 h. del microorganismo a probar en un tubo de ensaye de vidrio de 13X100 mm estéril, adicionando posteriormente 0.5 ml de plasma humano no diluido y previamente controlado. Se hizo girar el tubo suavemente para lograr la suspensión del microorganismo. Posteriormente se incubó a 35°C revisándolo las 4 primeras horas cada 30 min. Al revisar el tubo no se agitaba ni sacudía, se inclinaba con cuidado para observar si había coágulo. Si al cabo de 4 h. no había coágulo visible, se dejaba en incubación hasta el día siguiente (24 h) y se volvía a revisar.
- Si se había formado coágulo o filamentos de fibrina definidos, y éstos abarcan todo el tubo era prueba positiva completa, y si el coágulo no se extendía por toda la columna del líquido era parcial, pero fuese cualquiera el grado de coagulación se considero prueba positiva.
- La ausencia del coágulo, es decir, si la suspensión se había mantenido homogénea (igual que un tubo no inoculado) era prueba negativa.

F) DNAsa

Para esta prueba se utilizó la segunda versión de esta prueba consistente en la incorporación de azul de toluidina en el medio, ocasionando que la producción de enzimas cambie el color del medio, de azul a rosa.

- Para realizarla, el agar de prueba DNAsa con 0.2% de azul de toluidina se inoculó por estría recta con el microorganismo a probar. Se incubó a 35°C por 24 h. Al cabo de este tiempo se observó si alrededor del inóculo existía una

zona de aclaramiento de color rosa (halo rosado), lo que indicaba prueba positiva, si no había aparición de dicho halo era prueba negativa.

G) Reacción de la ureasa

- Para realizarla se inoculó el tubo con caldo de urea, a partir de un cultivo puro de 18 a 24 h, del microorganismo a probar. Se depositaron de 1 a 2 gotas del cultivo con una pipeta Pasteur estéril, agitando suavemente para lograr la suspensión de bacterias, se incubó a 35°C por 24 h, al cabo de este tiempo se observó el tubo.
- La aparición de un color rojo rosado intenso en todo el caldo era reacción positiva, si no se producía cambio de color se consideró reacción negativa.

H) Reducción de nitratos

- Se inoculó el tubo con caldo nitratos con el microorganismo a probar a partir de un cultivo líquido puro de 18-24 h., agitando suavemente, se incubó a 35°C por 24 h.. Al cabo de este tiempo se agregó de 2 a 3 gotas de Reactivo 1 (ácido sulfanílico + ácido acético), agitando suavemente, después se agregaron de 2 a 3 gotas de Reactivo 2 (alfa-naftilamina + ácido acético), se agitó.
- La aparición de un color rojo intenso dentro de los 30 seg. posteriores, indicó reacción positiva, y con ello la presencia de nitritos, la ausencia de dicho color indicó prueba negativa. Un resultado negativo fue confirmado por la adición de una pizca (aproximadamente 20 mg) de polvo de zinc (Zn) al tubo, verificando que el polvo de Zn estuviera exento de nitratos o nitritos. El desarrollo de un color rojo indicó la presencia de nitratos y por lo tanto que no se realizó la reducción.

I) Ornitina y Arginina decarboxilasas

- Se inoculó el medio de caldo arginina a partir de un cultivo puro de 18 a 24 h., agitando suavemente, posteriormente se cubrió el tubo con 3 o 5 gotas de aceite mineral estéril; en estas condiciones el O₂ del medio es consumido por el microorganismo y esto controla el pH. Se incubó a 35°C por 24 h.
- Para la ornitina, se inoculó el medio MIO a partir de un cultivo puro de 18 a 24 h. mediante la técnica de picadura. Posteriormente se adicionó de 2 a 4 gotas de aceite mineral estéril. Se incubó a 35°C por 24h.
- En ambas pruebas la aparición de un color purpúreo turbio a purpúreo amarillento apagado (producido por la cadaverina) se consideró reacción

positiva, mientras que la aparición de un color amarillo claro y brillante fue reacción negativa.

J) Voges Proskauer

- Se realizó inoculando el tubo con caldo VP a partir de un cultivo puro de 18 a 24 h., se incubó a 35°C por 24 h.. Al cabo de este tiempo se adicionaron 3 gotas de solución de alfa naftol al 5%, agitando suavemente. A continuación se adicionó 1 gota de solución de KOH al 40%. Se agitó nuevamente el tubo para exponer el medio al oxígeno atmosférico a fin de oxidar la acetoina y obtener una reacción de color. Se dejó reposar el tubo por lo menos durante 10 o 15 min. antes de intentar la interpretación del color.
- La presencia de un anillo color rojo rosado (presencia de acetoina) en la superficie del medio indicó reacción positiva; la aparición de un color amarillo (el mismo color del reactivo) o cobrizo (resultante de la mezcla de reactivos) en la superficie del medio fue reacción negativa.

K) Producción de hemolisinas

- Se sembró la cepa en estudio en una placa de agar sangre de carnero, y se incubó de 18 a 24 h.. Transcurrido dicho tiempo, se observó si alrededor de las colonias existía zona de hemólisis, esto es si se observaba una zona de aclaramiento. Para los casos en que se detectó dicha hemólisis la prueba se consideró positiva, aunque cabe señalar que algunas presentaron la producción de beta-hemolisina, la cual se detectó al observar zona de hemólisis alrededor de la colonia desde la superficie del agar hasta la base de la placa.

L) Resistencia a la novobiocina

- A partir de un cultivo puro de 18 a 24 h. se sembró masivamente el microorganismo a probar en un placa de agar sangre. Posteriormente se depositó un disco impregnado con novobiocina en una concentración de 5 microgramos, con la ayuda de unas pinzas Millipore. Se incubó a 35°C por 24 h.
- La aparición de un halo de inhibición menor o igual a 16 mm de diámetro indicó que el microorganismo era resistente a la novobiocina, un halo de diámetro mayor al mencionado indicó sensibilidad al antibiótico.

LL) Tamaño de colonia

Esta determinación no es propiamente una prueba bioquímica, sin embargo, especialmente en éste género adquiere una gran importancia dado que ayuda a la identificación de especies, por ello se incluye.

- En una placa de agar sangre donde fue sembrado el microorganismo en estudio, después de un período de 48 h. se midió el diámetro de una de las colonias con una regla.
- Si el diámetro resultante era igual o mayor a 6 mm. se consideró prueba positiva, y si el diámetro era inferior al antes mencionado, se consideró prueba negativa.

Para el género *Streptococcus*

M) Patrón de hemólisis

Más que prueba bioquímica, es una forma de identificar el patrón de hemólisis que produce la cepa en estudio, y así de acuerdo al patrón se pueden determinar las pruebas bioquímicas a aplicar a dicha cepa, ahorrándose con ello tiempo y reactivos.

- Para su realización se requirió sembrar mediante la técnica de aislamiento la cepa en estudio en una placa de agar sangre de carnero e incubarla a 35°C de 18 a 24 horas, después de este tiempo se realizó la lectura del patrón de hemólisis, tomando en cuenta la clasificación de Brown, mencionada con anterioridad en la sección de microorganismos empleados. Una vez determinado el patrón de hemólisis de la cepa en estudio, se consultó las tabla 3 y 4 de la parte de Generalidades, que indican a que grupo de Lancefield corresponden según el tipo de hemólisis que presentan, así como las pruebas bioquímicas que se les deben practicar.

N) Sensibilidad a la bacitracina (0.04 U)

- Para realizarla, fue necesario obtener un cultivo puro de 24 h en caldo BHI del estreptococo problema, a partir del cual se sembró masivamente con un asa bacteriológica toda la superficie de una placa de agar sangre de carnero, sobre la cual posteriormente se colocó, en condiciones asépticas, un disco que contenía 0.04 U de bacitracina. Se incubó a 35°C por 24 horas

- Una vez terminado el tiempo de incubación, se procedió a realizar la lectura; la prueba se consideró positiva si alrededor del disco se observó un halo de inhibición de, por lo menos, 10 mm de diámetro, si la dimensión del diámetro era inferior al indicado, o simplemente no existía, fue considerado como prueba negativa.

O) Prueba de hidrólisis del hipurato

- Se inoculó un tubo con medio de hipurato de sodio + caldo BHI (con un concentración final del 1%), con el microorganismo en estudio. Se incubó a 35°C por 24 h. Posteriormente se centrifugó el medio para compactar las células y se tomó una alícuota de 0.8 ml del sobrenadante, depositándola en un tubo de ensaye de 13X100 mm estéril. A continuación se agregaron 0.2 ml de reactivo de cloruro férrico al tubo y se mezcló bien.
- Si después de adicionar el reactivo, se formaba un precipitado denso de color café pardo, y éste desaparecía dentro de los 10 min. siguientes la reacción se consideró no específica, ya que tales resultados se debían a una interacción del cloruro férrico con el hipurato no hidrolizado o con las proteínas del medio. Si el precipitado persistía después de 10 minutos, se había formado benzoato de sodio, lo que indicaba hidrólisis y un resultado positivo, de lo contrario se consideró un resultado negativo.

P) Prueba de CAMP

- Se sembró en agar sangre de carnero una estría recta de una cepa de *S. aureus* (productora de beta-lisinas) y, previa esterilización del asa, se tomó una asada del estreptococo problema, para trazar estrías rectas perpendiculares a la de *S. aureus*, iniciando aproximadamente a 0.5 cm de esta última. La placa se incubó de 18 a 24 h., a 37°C.
- La prueba se consideró positiva si en la zona en la que convergen las dos hemolisinas (el factor de CAMP y la beta-lisina estafilocócica), se observaba una hemólisis más evidente, en forma de punta de flecha, la cual apunta hacia la estría de *S. aureus*.

Q) Prueba de bilis - esculina

- Se tomó una asada de un cultivo puro de 18 a 24 h. y se inoculó la superficie del agar bilis-esculina, mediante un estría en forma de S. Se incubó a 35°C de 18 a 24 h.

- La prueba se consideró positiva cuando se observó el ennegrecimiento (color negro) difuso en el agar inclinado, de lo contrario, se consideró prueba negativa

R) Capacidad para desarrollar en presencia de 6.5% de NaCl

- Las colonias bilis-esculina positivo se sembraron en una placa con agar BHI + 6.5% de NaCl. Se incubó a 35°C de 24 o 48 h.
- La lectura se efectuó después del período de incubación, considerando la prueba como positiva cuando la cepa lograba manifestar un evidente crecimiento en esta última placa. En caso de que no se apreciara crecimiento alguno en la placa, se consideró prueba negativa.

S) Prueba de susceptibilidad a la optoquina

- Se sembró masivamente un área de 3 cm de diámetro en un placa de agar-sangre de carnero, a partir de un cultivo puro de 18 a 24 h.. A continuación se colocó el disco de optoquina en el tercio superior del área sembrada. Se presionó suavemente el disco, para que se adhiriera a la superficie del agar. Se invirtió la placa e incubó a 35°C de 18 a 24 h.
- Una vez terminado el tiempo de incubación, se realizó la lectura de la siguiente manera, si se observaba una zona de inhibición de 14 mm o más alrededor del disco de optoquina con diámetro de 6 mm o una de 16 mm o más si se utiliza un disco con diámetro de 10 mm., se consideró prueba positiva, si no se observaba halo alguno, o éste era inferior al establecido, se consideró prueba negativa.

T) Reacción con antisueros

- Este tipo de reacciones consistieron en hacer reaccionar los anticuerpos anti-carbohidrato "C" presentes en los diversos sueros, con el antígeno (si es que este se encontraba), el cual consistió en células completas del estreptococo problema. Para ello se utilizó un cultivo líquido puro de 24 h, o bien, una asada de la colonia, resuspendida en 0.3 ml del buffer que trae el Kit a utilizar (solución de enzima de extracción). Se dejó incubar a 35°C por 30 min.. Transcurrido este tiempo se depositaron 5 gotas de la suspensión problema, una en cada uno de los círculos de la tarjeta de aglutinación, posteriormente, a un lado de cada gota de suspensión se depositó una gota de suero anti-A, al lado de la segunda una gota de anti-B y así sucesivamente. Las gotas se

homogeneizan con la ayuda de un bastoncillo (uno diferente para cada una de las 5 suspensiones).

- Agitar la tarjeta de aglutinación con un movimiento orbital, durante un minuto como máximo.
- La aparición de grumos de color rojo (aglutinación de partículas de látex) suspendidos en un fondo de color verde en los siguientes 60 seg. indicó prueba positiva. La positividad debió aparecer en solo una de las 5 gotas que se depositaron en la placa, los mencionados grumos indicaron homología entre el suero empleado y la suspensión. El grado de aglutinación dependía del tamaño del inóculo, del tiempo de incubación, del tamaño de la gota depositada del suero y del problema y de otros factores. Además se corrieron un control positivo y uno negativo, como control de calidad de la prueba.

Para este género también se realizaron las pruebas de *utilización de carbohidratos y arginina descarboxilasa*, de igual manera, que para el género *Staphylococcus*.

Para el género *Micrococcus*

A los microorganismos pertenecientes a éste género se les practicó la prueba de *utilización de carbohidratos*. Los carbohidrato empleado fue: xilosa. También se realizó la prueba de *arginina descarboxilasa, reducción de nitratos, y ureasa*.

Para el género *Leuconostoc*

Se realizó la prueba de *utilización de carbohidratos* de manera análoga a la mencionada anteriormente. Los carbohidratos utilizados fueron: arabinosa, rafinosa, manitol, maltosa, sacarosa, y trehalosa.

U) Formación de dextranas

- Se inoculó por estría en forma de S un cuadrante de una placa de agar nutritivo + 10% de sacarosa, partiendo de un cultivo puro de 18 a 24 h.. Se incubó a 28°C de 24 a 48 h.
- Al término de dicho tiempo se observó si hubo formación de dextranas, las cuales se identifican por la presencia de un crecimiento viscoso.

V) Crecimiento en AN + 3% de NaCl.

- En la superficie de una placa de agar nutritivo + 3% de NaCl, se sembró mediante la técnica de aislamiento el microorganismo en estudio.
- Se incubó a 28°C de 24 a 48 h..
- Se consideró prueba positiva, si después del período de incubación se apreciaba crecimiento sobre la superficie de la placa inoculada, de lo contrario se registró como prueba negativa.

Mediante el conjunto de pruebas bioquímicas practicadas a cada una de las cepas, se determinó la estabilidad de sus características.

Uniendo los resultados de las pruebas de pureza, viabilidad y estabilidad, practicados a las cepas procedentes del Cepario de la Facultad de Química se realizó el proceso de certificación, mientras que los resultados de las pruebas aplicadas a cepas procedentes de otras instituciones conforman el proceso de identificación. Cabe señalar que los resultados de las pruebas bioquímicas practicadas a cada cepa, ya fuera para identificación o certificación se iban recopilando en la ficha de registro correspondiente

2.2.4 Preservación

Para ello se empleó el método de secado en discos de agar y el de liofilización, empleando este último como método estándar de oro.

2.2.4.1 Secado en discos de agar

Para describir mejor el proceso de secado se dividió en 10 etapas.

1) Preparación de material

- Se cortaron círculos de polipapel, del tamaño del diámetro de la base de las cajas petri de vidrio a utilizar, dejando una pestaña de 0.5 cm., cuidando de no marcar el polipapel con plumón o pluma, preferentemente con lápiz, y de no romperlo. Se adhirió el polipapel a la base, colocando previamente unas gotas de agua, para facilitar la adherencia y se extendió perfectamente, de tal manera que no quedaran bordes, sino una superficie lo más lisa y plana posible. La caja de Petri se tapó y envolvió con papel para esterilizar. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 lb de presión, por 15 min. Se preparó una caja por cada cepa a preservar.

- Se prepararon tubos de ensayo de 13X100 mm con 2.7 ml de SSI, seis por cada cepa.
- Se prepararon viales con sílica gel con indicador de humedad. Primero se secó la sílica gel con indicador de humedad en horno de 70-90°C por 2 h., una vez transcurrido este tiempo se colocó en un frasco ámbar perfectamente cerrado. Después se depositó en los viales, llenando aproximadamente una cuarta parte del frasco, se taparon y se envolvieron con papel aluminio en forma individual y después todos juntos se envolvieron con papel para esterilizar. Se colocaron dentro de los cilindros metálicos y se esterilizaron en horno a 160°C por una hora. Las tapas de los viales se esterilizaron por separado en autoclave, envueltas en papel aluminio y papel para esterilizar.

- Medio de soporte

Se pesaron las siguientes cantidades, que varían dependiendo de la cantidad de medio que se deseaba preparar.

Lactosa	7 0 g.
Neopeptona	5.0 g.
Agar nutritivo	2.3 g
Agua destilada	100 ml

pH = 7.00 - 7.02

- La mezcla resultante se calentó hasta ebullición por 1 min., para la disolución total del medio. A continuación se vertió en tubos de ensayo de 22 X 175 mm con tapón de rosca, depositando 15 ml en cada tubo. Se esterilizó en autoclave a 118°C, 15 lb de presión por 15 min.. Posteriormente se sometió a prueba de esterilidad.

2) Preparación de cepas

- Se verificó pureza, viabilidad y estabilidad de las cepas a preservar.

3) Propagación

- Se sembró masivamente el cultivo puro en una placa de agar nutritivo, BHI o agar sangre dependiendo del microorganismo. Se incubó a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, por 24 h.. Se sembró una caja por microorganismo.

4) Cosecha

- Antes de realizar la cosecha, se llevó a cabo la tinción de Gram, y prueba de la catalasa al cultivo a cosechar. A la vez el medio de soporte se calentó mediante baño maría y entonces una vez fundido se dejó enfriar a temperatura ambiente, hasta que alcanzara una temperatura de 35°C aprox., a la cual se evitaba el matar al microorganismo por un exceso de temperatura, pero tampoco se dejó enfriar demasiado para evitar que el medio se solidificara. Posteriormente se recogió todo el crecimiento bacteriano (cosecha) presente en la placa de agar con una asa bacteriológica (previa esterilización) y se depositó el inóculo en el medio de soporte, para ello se raspaba ligeramente sobre la pared del tubo para que poco a poco cayera el inóculo y se suspendiera en el medio, así sucesivamente hasta recoger todo el crecimiento bacteriano, esterilizando el asa tantas veces fuera necesario y así evitar cualquier posible contaminación. Una vez recogido todo el crecimiento bacteriano, se agitó el tubo que contenía la suspensión, con un vortex hasta homogeneizar la suspensión, pero cuidando de tardarse lo menos posible, ya que se corría el riesgo de que el medio se solidificara en el tubo.
- Una vez homogeneizada la suspensión, se vació en una caja petri, dejándola solidificar (de 10-15 min.) y después se horadó el agar con la boquilla de una pipeta Pasteur estéril

5) Control de Calidad inicial

- Al término de las horadaciones, se tomó un disco de agar y se depositó en un tubo con 0.9 ml de SSI, se agitó constantemente hasta lograr disolver lo más posible el disco. Una vez disuelto, se tomó una alícuota de 0.1 ml y se depositó en un tubo con 0.9 ml, así sucesivamente hasta obtener una dilución 10^{-3} .
- De la última dilución se tomó una alícuota, con una asa bacteriológica calibrada de 10 μ l, la alícuota se depositó en el centro de una placa de agar y se extendió de manera radial.
- Se incubó a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, de 24 a 48 h.. Después de este tiempo se observó si el cultivo se encontraba puro y viable, además se realizó la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) por hojuela, para ello se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC} = \text{número de colonias} \times 10 \mu\text{l} \times \text{dilución}$$

Nota: Las actividades mencionadas del paso 2 al 5 se realizaron bajo condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar.

6) Congelamiento

- Una vez horadada la placa de agar se llevó a congelar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min., durante este lapso se preparó la bomba de vacío y el desecador. Para ello se verificó el nivel de aceite de la bomba y se conectó al desecador, a éste último se le colocó en su base una caja de petri con CaCl_2 anhidro como agente desecante.

7) Secado

- Se sacaron las cajas del congelador, se colocaron dentro del desecador y se conectó la bomba de vacío, se dejó de 18-24 h. con vacío (aprox. 23 plg. de Hg). Transcurrido este tiempo se desconectó la bomba y se conectó el desecador a un vacío menor, aprox. de 20 plg. de Hg., durante 2 días.

8) Distribución en viales

- Terminado el tiempo de secado se recogieron los discos de agar con una pinza Millipore estéril, bajo condiciones de esterilidad y se depositaron en los viales con sílica gel, se etiquetaron y se guardaron en gavetas. Cabe mencionar, que para empezar a despegar los discos de agar, primero se tuvo que verificar que estuvieran secos, para lo cual, al tratar de despegarlos del polipapel, si éstos se despegaban fácilmente estaban listos, pero si era difícil despegarlos, y se sentían chiclosos, era necesario dejarlos un día más en el desecador y después despegarlos.

9) Control de Calidad final

- De los discos de agar resultantes de cada cepa, se tomó uno y se depositó en 0.9 ml de SSI, se dejó el tiempo suficiente hasta la disolución total del disco de agar y de ésta dilución se realizaron otras dos, hasta obtener una dilución final de 10^{-3} .
- Una vez activo el microorganismo se sembró radialmente, en una placa de agar, utilizando una asa bacteriológica calibrada de $10\text{ }\mu\text{l}$. se incubó a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, de 24 a 48 h.. Transcurrido este tiempo se verificó si el cultivo estaba viable, puro y estable, además de realizar la cuenta de UFC como se mencionó anteriormente.

- Si las cepas cumplían con el control de calidad, al cual fueron sometidas, se guardaban a temperatura ambiente, para las que no fueron preservadas satisfactoriamente, se descartaron y volvieron a preservar.

10) Reactivación de cepas

- Para esto, se tomó un disco de agar de la cepa a probar con una pinza Millipore estéril y se depositó en un tubo de ensaye con caldo nutritivo, o BHI, según el microorganismo. Se agitó suavemente el tubo y se incubó a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, de 24 a 48 h., a partir de este cultivo se realizaron las pruebas de pureza, viabilidad y estabilidad correspondientes. Este paso se realizó cada mes.

2.2.4.2 Liofilización

El proceso de liofilización se dividirá en 10 etapas para una descripción más detallada.

1) Preparación de material y medio de soporte

Material

- Se esterilizaron en autoclave, agujas para tráquea, introducidas en tubos de ensayo de 16X150 mm con tapón de rosca y en el fondo de éstos se colocó un pedazo de algodón.
- Jeringas estériles Plastipak de 3 ml.
- Tubos de ensayo de 13X100 mm con 2.7 ml de SSI para diluciones del Control de Calidad.
- Ampolletas. Se cortaron etiquetas de 3 cm de largo x 0.5 cm de ancho, dejando un margen de 1 cm y a partir de este se escribió el nombre científico del microorganismo a liofilizar por un lado, y por el otro lado se escribió fecha y clave de liofilización, dejando el mismo margen, se realizó la escritura con lápiz para algunas cepas y para otras se empleó la computadora con impresión laser, para evitar corrimiento de la letra al contacto con la suspensión celular. Se introdujo la etiqueta con el margen hacia abajo en la ampolleta. Se taparon con gasa y algodón las ampolletas de un mismo microorganismo, se envolvieron juntas con papel aluminio y después con papel para esterilizar escribiendo sobre él, el nombre del microorganismo del que se trataba. Se esterilizaron en autoclave a 121°C, 15 lb de presión, por 15 min.

Medio de soporte

- Se pesó la cantidad de medio indicada para preparar leche descremada al 10%, posteriormente se vació en tubos de ensayo de 16X150 mm, depositando 8 ml en cada tubo. Se esterilizaron en autoclave a 110°C por 30 min. Se sometieron a prueba de esterilidad.
- 2) Preparación de cepas
- Se verificó pureza, viabilidad y estabilidad del microorganismo a preservar.
- 3) Propagación
- Se sembró masivamente el microorganismo en placas de agar nutritivo, BHI, o agar sangre dependiendo del microorganismo. Se incubó a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo de 24 a 48 h..
- 4) Cosecha
- Previamente se verificó la pureza de la cepa, mediante tinción de Gram y prueba de la catalasa. A continuación se realizó la cosecha, es decir, con el asa bacteriológica, previa esterilización se recogió todo el crecimiento bacteriano presente sobre la superficie de la placa de agar, y se suspendió en leche descremada al 10% contenida en tubos de ensayo. Posteriormente en un vórtex, se agitó, para homogeneizar la suspensión celular.
- 5) Llenado de ampolletas
- Se llenaron las ampolletas, utilizando jeringas estériles con agujas para tráquea estériles, tomando así la suspensión y depositando 0.3 ml en el fondo de cada ampolleta cuidando de no ensuciar la parte superior de la misma.
 - Se introdujo perfectamente el tapón de algodón de las ampolletas y se cortó el sobrante y se depositaron en los frascos para liofilización.
- 6) Congelamiento
- Los frascos llenos se llevaron a congelar a -70°C de 18-24 h., se colocaron los frascos en forma vertical, no acostados para evitar que se derramara la suspensión a lo largo de la ampolleta.
- 7) Control de Calidad inicial
- De la suspensión sobrante se tomaron 0.3 ml y se colocaron en un tubo con 2.7 ml de SSI, se homogeneizó.
 - Se tomaron 0.3 ml de la dilución anterior y se depositaron en otro tubo con 2.7 ml de SSI, se realizó otra dilución para obtener finalmente 3 diluciones

seriadas. De esta última dilución se tomó una alícuota de 10 μ l con una asa bacteriológica calibrada y se depositó en el centro de una placa de agar (AN, o ABHI dependiendo del microorganismo) y se procedió a estriar en forma radial; es decir, a partir del inóculo central se arrastra con el asa estriando de arriba hacia abajo, a la vez que se gira la placa de agar, pasando siempre por el centro. Este procedimiento nos ayudó a aislar las colonias y esto facilitó el conteo en placa. Se incubó a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, de 24 a 48 h.. Transcurrido este tiempo se procedió a contar las colonias presentes en cada placa y determinar así, las UFC por ampolleta, además de que se verificó si existía contaminación o no, en caso de que se observara más de un tipo de colonias, se descartaron las ampolletas de esa cepa.

8) Liofilización

- Antes de sacar los frascos del congelador, se conectó la liofilizadora, para que alcanzará una temperatura de -50°C y el vacío se estabilizara. Bajo estas condiciones se colocaron los frascos en las llaves de las liofilizadora. Se cubrieron los frascos con hielo para evitar que se descongelaran rápidamente las ampolletas, se colocaron cápsulas de porcelana como base de los frascos para evitar derramar agua sobre la liofilizadora. Durante la primera hora de liofilización se cuidó que no se licuaran las suspensiones, ya que si esto ocurría era necesario parar el proceso y volver a congelar y liofilizar posteriormente. Si se licuaban nuevamente era necesario volver a iniciar el proceso, desde la preparación del cultivo, pues los procesos de licuado, congelamiento ya habían dañado demasiado a las células.
- Si no se licuaban las suspensiones, entonces se continuaba la liofilización. Alrededor de 2 a 3 horas posteriores, la superficie externa de la suspensión se volvía seca y así continuaba hasta secarse por completo. Después de un tiempo de 6 h. aprox., se verificó que estuvieran completamente liofilizados, esto se determinaba al observar una pasta compacta y uniforme en el fondo de la ampolleta, además de que la base del frasco ya no estaba fría. Si esto sucedía se apagaba el equipo.

9) Sellado de ampollitas

- Se procedió a sellar las ampollitas, para ello se sacaron las ampollitas de los frascos y se les introdujo el tapón del algodón hasta donde termina la etiqueta, con la ayuda de un asa bacteriológica. Posteriormente se prendió el soplete de gas-oxígeno, modulando la flama, hasta que ésta presentara un color azul claro. Entonces a la altura de un centímetro arriba del tapón de algodón se colocaba la ampollita, en la flama, a la vez que se iba girando y así se suavizaba el vidrio, al sentir esto último se estiraba suavemente el vidrio y se sacaba de la flama. De esta manera se realizó el alargamiento de la ampollita, éste no debía de realizarse con gran fuerza pues se corría el riesgo de sellar por completo la ampollita, o de alargarla demasiado y al momento del sellado se rompía. En seguida las ampollitas alargadas se colocaban en la araña, por la parte abierta. La araña a su vez estaba conectada a una de las entradas de la liofilizadora y se prendió el vacío de ésta. Entonces el vacío llegaba a las ampollitas conectadas a la araña, se dejó de 2 a 3 min. a que se estabilizara el vacío y se verificó el vacío dentro de cada ampollita mediante un generador de alta frecuencia, chequeando si se generaba una luz de color azul-morada, producida al contacto con el vacío, en el interior de la ampollita. Después con el soplete al cual se le disminuyó la intensidad de la flama, se sellaron,. Para ello se posesionó la flama a la altura de la parte alargada, a la vez que se giró la ampollita y se jaló hacia abajo, quedando así sellada.

10) Control de Calidad final.

- Se tomó una ampollita de cada una de las cepas liofilizadas, la cual se hidrató y se sometió a prueba de viabilidad, pureza y estabilidad, así como al conteo de colonias en placa, para determinar con esto último, el tiempo posible que duraría la cepa preservada. Para ello, se realizaron las diluciones indicadas en el inciso del Control de Calidad inicial. Si el porcentaje resultante del conteo en placa era inferior al 50% original (antes de liofilizar), las ampollitas eran descartadas, si sucedía lo contrario, se almacenaban en refrigeración.

2.2.5 Control de Calidad

Además del control de calidad inicial y final realizado en ambos procesos de preservación, se realizó un control de calidad cada mes a las cepas preservadas en discos de agar. Dicho control de calidad consistió en la reactivación de cepas,

siembra en placas de agar, y de las colonias resultantes se procedió a realizar tinción de Gram, prueba de la catalasa, oxidasa, así como pruebas bioquímicas base. Así dependiendo del género se realizaron:

Staphylococcus: tinción de Gram, catalasa, oxidasa, coagulasa y DNasa.

Streptococcus: tinción de Gram, catalasa, reacción con antisueros o utilización de carbohidratos.

Micrococcus: tinción de Gram, catalasa, utilización de carbohidratos.

Leuconoctoc: tinción de Gram, catalasa, producción de dextranas.

2.2.6 Análisis Estadístico

Una vez realizado el control de calidad mensual, al cabo de 8 meses de almacenamiento, se determinó el número de cepas recuperadas para cada método de preservación, y con base en éstos datos se aplicó la *Distribución Gaussiana* también llamada Distribución Normal, para ello se emplearon las siguientes fórmulas :

$$z = \frac{P_1 - P_2}{\sigma_{P_1-P_2}}$$

$$\sigma_{P_1-P_2} = \sqrt{p(1-p)(1/n_1 + 1/n_2)}$$

$$p = \frac{n_1 P_1 + n_2 P_2}{n_1 + n_2} = \text{promedio ponderado}$$

donde:

P_1 y P_2 son las proporciones muestrales de dos muestras grandes de tamaño n_1 y n_2 , extraídas de poblaciones respectivas que tiene proporciones p_1 y p_2 .⁴⁰

Ejemplo:

Para el cuarto mes, se tiene:

$$z = (0.69) - (0.70) / 0.0777 = 0.1286$$

$$\sigma_{P_1-P_2} = (0.70)(0.30) (1/69 + 1/70) = 0.0777$$

$$p = \frac{70(69) + 70(70)}{(65 + 70)} = 70$$

Para un alfa = 0.5% el valor teórico de z (sacado de tablas), considerando que se realiza una comparación entre dos métodos, se obtiene el valor a dos colas de 1.96

Así, se calculó el valor de z, para el cuarto, quinto y sexto mes, y de acuerdo a éstos valores se realizó la gráfica correspondiente.

3 RESULTADOS

De las 5 etapas realizadas en la parte experimental, la primera y segunda, correspondientes a reactivación de cepas y comprobación de pureza y viabilidad, respectivamente, para las 51 cepas presentes en el acervo bacteriano del Cepario de la Facultad de Química, no presentaron problema alguno en el proceso de hidratación; no así, en lo que respecta a la prueba de pureza y viabilidad, ya que cinco de ellas se encontraron contaminadas, y dos no viables (Tabla 11).

Tabla 11

Relación de cepas procedentes de la Colección de cocos gram positivos del Acervo Bacteriano del Cepario de la Facultad de Química

GÉNERO	TOTAL	No. DE CEPAS PURAS	No. DE CEPAS CONTAMINADAS	No. DE CEPAS NO VIABLES
<i>Staphylococcus</i>	20	17	2	1
<i>Streptococcus</i>	22	18	3	1
<i>Micrococcus</i>	4	4	0	0
<i>Leuconostoc</i>	5	5	0	0
TOTAL	51	44	5	2

Las dos cepas que se encontraron no viables, se reactivaron otra vez, a partir de una nueva ampolla del mismo lote, encontrándose nuevamente, que eran no viables, y por lo tanto fueron descartadas. Las que presentaron contaminaciones, se sometieron a procesos de separación en los medios de cultivo correspondientes, lográndose purificar, y trabajar finalmente con 49 cepas del acervo bacteriano.

De instituciones externas, como, INER, INP e INNSZ, se registraron un total de 21 cepas (Tabla 12), recibidas cada una en una placa de agar sangre para los estreptococos y Mueller-Hinton para los estafilococos. De las 21 cepas sólo tres se encontraron contaminadas, cabe mencionar que el mismo día que eran recibidas, fue necesario resembrarlas en los medios de cultivo correspondientes, para evitar que perdieran su viabilidad.

Tabla 12

Relación de cepas procedentes de Instituciones Externas

GÉNERO	PROCEDENCIA	TOTAL	No. DE CEPAS PURAS	No. DE CEPAS CONTAMINADAS
<i>Staphylococcus</i>	INER	4	3	1
	INP	7	5	2
	INNSZ	1	1	0
<i>Streptococcus</i>	INER	0	0	0
	INP	0	0	0
	INNSZ	9	9	0
TOTAL		21	18	3

Las cepas que presentaron contaminación, fueron sometidas a procesos de separación. De tal forma que las 49 cepas del acervo bacteriano y 21 de la instituciones, conformaron las 70 cepas que se probaron en este estudio.

En la tercera etapa, correspondiente a Identificación y/o Certificación, se realizó la siguiente serie de pruebas generales y bioquímicas para las 70 cepas, cuyo patrón de resultados determinó el género y la especie del microorganismo a identificar y/o certificar.

Tabla 13

Conjunto de pruebas generales realizadas para la identificación de género de las cepas en estudio

PRUEBA	GÉNERO			
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Leucanostoc</i>
Tinción de Gram	cocos gram positivos, agrupados en racimos y cadenas.	cocos, gram positivos, agrupados en cadenas	cocos, gram positivos agrupados en pares, cadenas y tetradas	cocos gram positivos, agrupados en pares y en cadenas.
Morfología colonial *	colonias de 2 a 4 mm de diámetro, redondas, convexas, de bordes regulares, de consistencia butirosa, con pigmentos que van desde el blanco, hasta el amarillo, hemolíticas.	Colonias de 1.5 mm de diámetro, redondas, traslúcidas, grisáceas, convexas, de bordes regulares, hemolíticas.	colonias de 1mm de diámetro, redondas, convexas, de bordes regulares, con pigmentos que van desde el amarillo, naranja hasta el rosa.	colonias menores a 1mm de diámetro, redondas, convexas, grisáceas

Tabla 13 Continuación

PRUEBA	GÉNERO			
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>
Catalasa	+	-	+	-
Producción de ácido a partir de:				
glucosa**	+		+	
glucosa***	+		-	
Crecimiento en AN ¹		-		+

Abreviaturas: * la morfología que se describe es la encontrada en agar nutritivo para *Micrococcus* y *Leuconostoc* y en agar sangre para *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

¹ AN, indica Agar Nutritivo.

▨ No se realizaron

** Bajo condiciones aeróbicas

*** Bajo condiciones anaeróbicas.

Símbolos: +, Reacción positiva; -, Reacción negativa

Tabla 14

Patrón de resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de especie a las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus*

PRUEBA	ESPECIES					
	<i>S. aureus</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Tamaño de la colonia ¹	+	-	-	-	-	+
Pigmento ²	+	-	-	-	-	-
Coagulasa	+	-	-	-	-	-
DNasa	+	-	-	-	-	-
Hemolisinas	+	-	-	-	(+)	-
VP	+	-	+	d	+	+
Utilización de arginina	+	d	d	d	-	-
Reducción de nitratos	+	d	+	d	+	-
Ornitina decarboxilasa	-	-	d	-	+	-
Ureasa	d	-	+	+	d	+
Resistencia a la novobiocina	-	-	-	-	-	+
Producción de ácido a partir de:						
Trehalosa	+	(+)	-	d	+	+
Manitol	+	-	-	-	-	d
Manosa	+	-	(+)	-	+	-
Maltosa	+	(+)	+	+	+	+
Lactosa	+	-	d	d	+	d
Sacarosa	+	d	+	(+)	+	+

Símbolos: +, Reacción positiva, -, Reacción negativa, d, Reacción variable, (+), Reacción retardada

¹ Se consideró +, si el diámetro de la colonia era mayor o igual a 6 mm después de una incubación a 35°C por 48 h

² Se consideró +, si se detectaba visualmente la presencia de pigmentos carotenoides, durante su crecimiento a 35°C

Tabla 15
Patrón de resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de especie a las cepas pertenecientes al género *Streptococcus*, con hemólisis α y β

PRUEBAS	ESPECIES			
	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. gbo. viridans</i>
Hemólisis	beta	beta	alfa	alfa
Bacitracina	+	-	-	-
Optoquina	-	-	+	-
CAMP	-	+	-	-
Hidrólisis de hipurato	-	+	-	-
Bilis-Esculina	-	-	-	-
Reacción con antisueros	positiva para el grupo A	positiva para el grupo B	negativa para todos	negativa para todos

Simbolos. +, Reacción positiva -, Reacción negativa

Tabla 16
Patrón de resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de especie a las cepas pertenecientes al género *Streptococcus*, con hemólisis β y N.H.

PRUEBAS	ESPECIES					
	<i>S. faecalis</i>	<i>S. faecium</i>	<i>S. durans</i>	<i>S. equi</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>
Hemólisis	beta	N.H.	N.H.	beta	N.H.	N.H.
Bilis-esculina	+	+	+	-	-	-
CAMP	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en AN+NaCl 6.5%	+	+	+	-	-	-
Producción de ácido a partir de:						
Manitol	+	+	-	-	+	-
Lactosa	+	+	+	-	+	+
Arabinosa	-	+	-	-	-	-
Melezitosa	+	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	-	+	+	-
Utilización de arginina	+	+	+	+	-	+

Simbolos +, Reacción positiva -, Reacción negativa
 Abreviaturas: N.H., No hemolítico

Tabla 17

Patrón de resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de especie a las cepas pertenecientes al género *Micrococcus*

PRUEBAS	ESPECIES			
	<i>M. flavus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>M. lysodeikticus</i>	<i>M. roseus</i>
Pigmento	amarillo	amarillo	amarillo	rojo rosado
Hemólisis	N.H.	N.H.	N.H.	N.H.
Ureasa	-	-	-	-
Reducción de nitratos	-	-	-	+
Utilización de arginina	-	-	-	-
Utilización de xilosa	-	-	-	+

Símbolos: +, Reacción positiva; -, Reacción negativa; d, Reacción variable.
Abreviaturas: N.H., No hemolítica

Tabla 18

Patrón de resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de especie a las cepas pertenecientes al género *Leuconostoc*

PRUEBAS	ESPECIES		
	<i>L. cremoris</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>L. paramesenteroides</i>
Formación de dextranas	-	+	-
Crecimiento en AN+ 3% de NaCl	-	+	-
Formación de ácido a partir de:			
Arabinosa	+	-	-
Sacarosa	+	-	+
Trehalosa	+	-	+
Manitol	-	-	-
Maltosa	+	-	+
Rafinosa	-	-	-

Símbolos: +, Reacción positiva; -, Reacción negativa.
Abreviaturas: AN, Agar Nutritivo; NaCl, Cloruro de sodio.

Empleando los patrones de resultados mostrados de la tabla 13 a la 18, se realizaron 21 identificaciones, y 47 certificaciones (Tabla 19). Además se realizaron 2 reclasificaciones de cepas, debido a que una cepa etiquetada como *S. zooepidemicus*, resultó ser *S. agalactiae* y otra con etiqueta de *L. citrovorum* (DRI-VAC), se identificó como *L. paramesenteroides*.

Tabla 19
Relación de las certificaciones e identificaciones efectuadas a las cepas en estudio

GÉNERO	PROCEDENCIA	No. DE CERTIFICACIONES	No. DE IDENTIFICACIONES
<i>Staphylococcus</i>	INER		4
	INP		7
	INNSZ		1
	Cepario de la F. Q.	19	
<i>Streptococcus</i>	INNSZ		9
	Cepario de la F. Q.	20	
<i>Micrococcus</i>	Cepario de la F. Q.	4	
<i>Leuconostoc</i>	Cepario de la F. Q.	4	
TOTAL		47	21

En la cuarta etapa, correspondiente a Preservación, se logró preservar por secado en discos de agar y liofilización las 70 cepas, obteniéndose una buena viabilidad durante los seis meses de almacenamiento, después de haber sido preservados (Tabla 20). En lo que respecta a pureza durante los primeros 4 meses de almacenamiento todas las cepas se encontraron puras, sin embargo a partir del quinto mes una cepa del género *Staphylococcus* (*S. epidermidis*) y otra del género *Streptococcus* (*S. faecalis*) presentaron contaminaciones, específicamente con colonias de *S. aureus*. Posteriormente al sexto mes otra cepa del género *Streptococcus* (*S. pyogenes*) presentó contaminación (Tabla 21). Para la evaluación de estabilidad sólo dos cepas del género *Micrococcus* presentaron alteraciones en la intensidad del color de su pigmento, *M. roseus* al inicio del cuarto mes de almacenamiento y *M. lysodeikticus* al inicio del sexto mes (Tabla 22).

Tabla 20
Relación de la viabilidad durante el período de almacenamiento de las 70 cepas preservadas

Microorganismo	TOTAL	Nº. DE CEPAS MOJUZADAS	Nº. DE CEPAS SECAS EN DISCOS DE AGAR	VIABILIDAD																	
				1 MES		2 MESES		3 MESES		4 MESES		5 MESES		6 MESES							
Tiempo de almacenaje				S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L				
Método de preservación																					
<i>S. aureus</i>	17	17		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17				
<i>S. auricularis</i>	2	2		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2				
<i>S. epidermidis</i>	7	7		7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7				
<i>S. hominis</i>	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3				
<i>S. lugdunensis</i>	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>S. saprophyticus</i>	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>S. agalactiae</i>	10	10		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10				
<i>S. cremoris</i>	2	2		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2				
<i>S. durans</i>	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>S. equi</i>	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>S. faecalis</i>	5	5		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5				
<i>S. faecium</i>	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>S. lactis</i>	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>S. pneumoniae</i>	2	2		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2				
<i>S. pyogenes</i>	5	5		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5				
<i>S. gpo. viridans</i>	2	2		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2				
<i>M. flavus</i>	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>M. luteus (ATCC 9341)</i>	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>M. lysodeikticus</i>	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>M. roseus</i>	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>L. cremoris (NRRL-B634)</i>	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
<i>L. mesenteroides</i>	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3				
<i>L. paramesenteroides</i>	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				

1 Abreviaturas. Métodos de preservación S secado en discos de agar y L iofización. Géneros S: *Staphylococcus*, S: *Streptococcus*, M: *Micrococcus* y L: *Leuconostoc*, respectivamente

Tabla 21

Relación de la pureza durante el período de almacenamiento de las 70 cepas preservadas

Microorganismo	TOTAL	Nº. DE CEPAS BIOFILIZADAS	Nº. DE CEPAS SECAS EN DISCOS DE AGAR	PUREZA																	
				1 MES		2 MESES		3 MESES		4 MESES		5 MESES		6 MESES							
Tiempo de almacenaje				S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L				
Método de preservación				17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17				
<i>S. aureus</i>	17	17	17																		
<i>S. auricularis</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2					
<i>S. epidermidis</i>	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7					
<i>S. hominis</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3					
<i>S. lugdunensis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
<i>S. saprophyticus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
<i>S. agalactiae</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10					
<i>S. cremoris</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2					
<i>S. durans</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
<i>S. equi</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
<i>S. faecalis</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5					
<i>S. faecium</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
<i>S. lactis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
<i>S. pneumoniae</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2					
<i>S. pyogenes</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5					
<i>S. gpo. viridans</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2					
<i>M. flavus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
<i>M. luteus</i> (ATCC 9341)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
<i>M. lysodeikticus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
<i>M. roseus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
<i>L. cremoris</i> (NRRL-B634)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
<i>L. mesenteroides</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3					
<i>L. paramesenteroides</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					

²Abreviaturas: Métodos de preservación: S: secado en discos de agar y L: Liofilización. Géneros: S: *Staphylococcus*, M: *Micrococcus* y L: *Leuconostoc*, respectivamente.

Tabla 22
Relación de la estabilidad durante el período de almacenamiento de las 70 cepas preservadas

Microorganismo	TOTAL	Nº DE CEPAS EIOFILIZADAS	Nº DE CEPAS SECAS EN DISCOS DE AGAR	ESTABILIDAD																	
				1 MES		2 MESES		3 MESES		4 MESES		5 MESES		6 MESES							
Tiempo de almacenaje				S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L		
Método de preservación				17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17		
<i>S. aureus</i>	17	17	17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>S. auricularis</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
<i>S. epidermidis</i>	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7		
<i>S. hominis</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
<i>S. lugdunensis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>S. saprophyticus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>S. agalactiae</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		
<i>S. cremoris</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
<i>S. durans</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>S. equi</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>S. faecalis</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
<i>S. faecium</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>S. lactis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>S. pneumoniae</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
<i>S. pyogenes</i>	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
<i>S. gpo. viridans</i>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
<i>M. flavus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>M. luteus (ATCC 9341)</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>M. lysodeikticus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>M. roseus</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>L. cremoris (NRRL-B634)</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
<i>L. mesenteroides</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
<i>L. paramesenteroides</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		

³ Abreviaturas: Métodos de preservación. S: secado en discos de agar y L: liofilización. Géneros. S: *Streptococcus*, M: *Micrococcus* y L: *Leuconostoc*, respectivamente.

**MÉTODO DE SECADO EN DISCOS DE AGAR
NÚMERO DE CEPAS RECUPERADAS POR GÉNERO, EXPRESADAS EN
PORCIENTO PARA CADA PARÁMETRO DE EVALUACIÓN**

Tabla 23

Porciento de la viabilidad de las cepas preservadas/mes de almacenamiento

GÉNERO	TOTAL	VIABILIDAD					
		No. de meses					
		1	2	3	4	5	6
<i>Staphylococcus</i>	31	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Streptococcus</i>	30	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Micrococcus</i>	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Leuconostoc</i>	5	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla 24

Porciento de la pureza de las cepas preservadas/mes de almacenamiento

GÉNERO	TOTAL	PUREZA					
		No. de meses					
		1	2	3	4	5	6
<i>Staphylococcus</i>	31	100%	100%	100%	100%	96.8%	96.8%
<i>Streptococcus</i>	30	100%	100%	100%	100%	96.7%	93.3%
<i>Micrococcus</i>	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Leuconostoc</i>	5	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla 25

Porciento de la estabilidad de las cepas preservadas/mes de almacenamiento

GÉNERO	TOTAL	ESTABILIDAD					
		No. de meses					
		1	2	3	4	5	6
<i>Staphylococcus</i>	31	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Streptococcus</i>	30	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Micrococcus</i>	4	100%	100%	100%	100%	100%	100%
<i>Leuconostoc</i>	5	100%	100%	100%	75%	75%	50%

Como ya se explicó anteriormente con las tablas 20, 21 y 22, durante los primeros 3 meses de almacenamiento, las cepas preservadas mediante secado en discos de agar al igual que las liofilizadas, se mantenían viables, puras y estables. Sin embargo a partir del cuarto mes de almacenamiento, las cepas preservadas en discos de agar empezaron a presentar cambios, a partir del cuarto mes se presentaron alteraciones en la estabilidad de dos cepas y al quinto mes contaminaciones en algunas otras, por ello se

anexan las tablas 23, 24 y 25, que expresan y resumen las alteraciones presentadas por género para cada mes de almacenamiento.

COMPARACIÓN DE LOS DOS MÉTODOS DE PRESERVACIÓN

Para realizar la comparación de los dos métodos de preservación empleados, se cuantifico el número de cepas recuperadas, en base a los parámetros de evaluación: viabilidad, pureza y estabilidad, a partir del cuarto mes, en el cual se empezaron a presentar las alteraciones en las cepas preservadas hasta el sexto mes, ya que en el séptimo y octavo mes no se presentaron más cambios (Tablas 26, 27 y 28).

Tabla 26
Número de cepas recuperadas por género para cada método de preservación al cuarto mes

GÉNERO	TOTAL	SECADO	LIOFILIZACIÓN
<i>Staphylococcus</i>	31	31 (100%)	31 (100%)
<i>Streptococcus</i>	30	30 (100%)	30 (100%)
<i>Micrococcus</i>	4	3 (75%)	4 (100%)
<i>Leuconostoc</i>	5	5 (100%)	5 (100%)
TOTAL DE CEPAS RECUPERADAS		69 (98.6%)	70 (100%)

Tabla 27
Número de cepas recuperadas por género para cada método de preservación al quinto mes

GÉNERO	TOTAL	SECADO	LIOFILIZACIÓN
<i>Staphylococcus</i>	31	30 (96.8%)	31 (100%)
<i>Streptococcus</i>	30	29 (96.7%)	30 (100%)
<i>Micrococcus</i>	4	3 (75%)	4 (100%)
<i>Leuconostoc</i>	5	5 (100%)	5 (100%)
TOTAL DE CEPAS RECUPERADAS		67 (95.7%)	70 (100%)

Tabla 28
Número de cepas recuperadas por género para cada método de preservación al sexto mes

GÉNERO	TOTAL	SECADO	LIOFILIZACIÓN
<i>Staphylococcus</i>	31	30 (96.8%)	31 (100%)
<i>Streptococcus</i>	30	28 (93.3%)	30 (100%)
<i>Micrococcus</i>	4	2 (50%)	4 (100%)
<i>Leuconostoc</i>	5	5 (100%)	5 (100%)
TOTAL DE CEPAS RECUPERADAS		65 (92.8%)	70 (100%)

Aplicando la prueba estadística de *Distribución Gaussiana* (distribución normal) al número de cepas recuperadas, para probar que *no existe diferencia significativa* entre los dos métodos empleados, tomando como método estándar la liofilización, a partir del cuarto mes, se tiene:

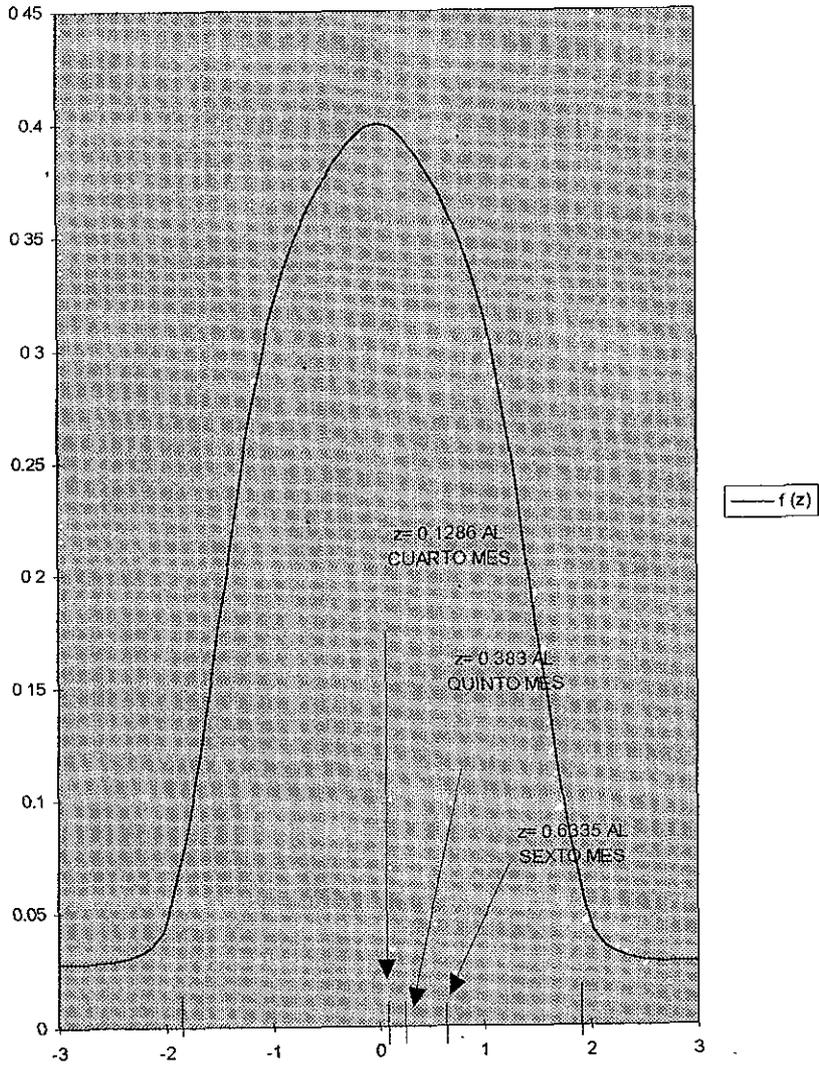
Tabla 29
Comparación estadística de ambos métodos de preservación

MES	CEPAS RECUPERADAS		VALOR DE Z
	SECADO	LIOFILIZACIÓN	
4TO. MES	69	70	0.1266
5TO. MES	67	70	0.3830
6TO. MES	65	70	0.6335

Para un alfa= 5%, el valor teórico de z, es de 1.96, por lo tanto, dado que los valores de z, obtenidos experimentalmente son inferiores a 1.96, es decir, se encuentran dentro del rango de aceptación establecido, *no, hay diferencia significativa en los dos métodos de preservación*. Dichos valores se indican en la gráfica 1.

En el séptimo, y octavo mes, no se presentó disminución en el número de cepas recuperadas para el método de secado en discos de agar, si no que permaneció de igual manera que en lo reportado para el sexto mes

GRAFICA 1
ANÁLISIS ESTADÍSTICO
DISTRIBUCIÓN GAUSSIANA



Rango de aceptación de -1.96 a 1.96

Finalmente al cabo de 8 meses de almacenamiento, las cepas recuperadas fueron 65 para secado en discos de agar y 70 para liofilización. Dentro de las 65 cepas recuperadas del secado, el 46% corresponde al género *Staphylococcus*, el 43% al género *Streptococcus*, el 8% al género *Leuconostoc* y el 3% al género *Micrococcus*, como se puede apreciar en la Gráfica 3. Para el método de liofilización de las 70 cepas recuperadas, el 44%, 43%, 7% y 6%, corresponden al género *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Micrococcus*, respectivamente como se indica en la Gráfica 2.

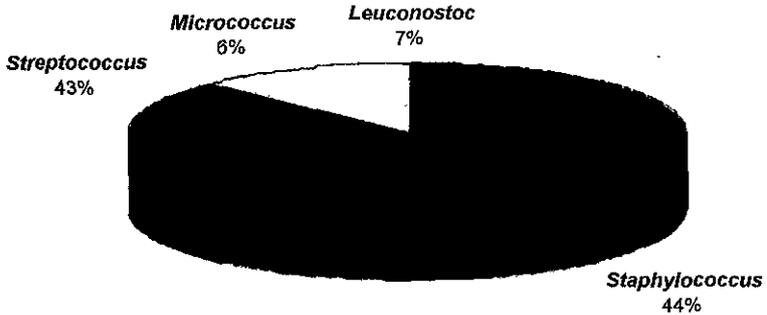
En la quinta y última etapa del presente estudio, correspondiente al control de calidad, se monitoreo mensualmente la viabilidad, pureza y estabilidad de cada una de las cepas preservadas por ambos métodos, a lo largo de 8 meses, dichos resultados se muestran en las tablas 20, 21, 22, 23, 24, y 25, a través de las cuales se puede observar que para el método de secado se presentaron pérdidas de pureza y estabilidad en ciertas cepas. Además, se realizaron cuentas de unidades formadoras de colonias (UFC) antes y después de cada proceso de preservación, para estimar la pérdida de células durante el proceso al que fueron sometidas. De esta manera, para determinar el número de unidades formadoras de colonias, se realizó la siguiente operación:

$$\text{UFC} = \text{número de colonias} \times 10 \mu\text{l} \times \text{dilución}$$

y se obtuvieron los siguientes resultados, resumidos en promedios para cada género en estudio (Tabla 30 y 31).

GRÁFICA 2

PORCENTAJES DE CEPAS RECUPERADAS POR GÉNERO PARA EL MÉTODO DE LIOFILIZACIÓN



GRAFICA 3

PORCENTAJE DE CEPAS RECUPERADAS POR GÉNERO PARA EL MÉTODO DE SECADO EN DISCOS DE AGAR

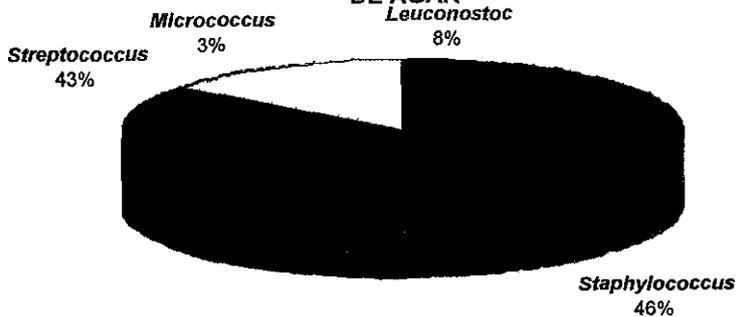


Tabla 30
Relación de UFC resultantes en el Secado en discos de Agar

MÉTODO DE SECADO EN DISCOS DE AGAR			
CONTROL DE CALIDAD INICIAL		CONTROL DE CALIDAD FINAL	
GÉNERO	UFC/DISCO DE AGAR (PROMEDIO)	GÉNERO	UFC/DISCO DE AGAR (PROMEDIO)
<i>Staphylococcus</i>	2.4×10^{13}	<i>Staphylococcus</i>	2.4×10^{13}
<i>Streptococcus</i>	2.4×10^{13}	<i>Streptococcus</i>	2.3×10^{13}
<i>Micrococcus</i>	2.3×10^{13}	<i>Micrococcus</i>	2.3×10^{13}
<i>Leuconostoc</i>	2.3×10^{13}	<i>Leuconostoc</i>	2.3×10^{13}

Tabla 31
Relación de UFC resultantes en la liofilización

MÉTODO DE LIOFILIZACIÓN			
CONTROL DE CALIDAD INICIAL		CONTROL DE CALIDAD FINAL	
GÉNERO	UFC/LIOFILIZADO	GÉNERO	UFC/LIOFILIZADO
<i>Staphylococcus</i>	2.6×10^{13}	<i>Staphylococcus</i>	2.2×10^{13}
<i>Streptococcus</i>	2.4×10^{13}	<i>Streptococcus</i>	1.9×10^{13}
<i>Micrococcus</i>	2.4×10^{13}	<i>Micrococcus</i>	2.0×10^{13}
<i>Leuconostoc</i>	2.4×10^{13}	<i>Leuconostoc</i>	2.0×10^{13}

Símbolos: UFC, unidades formadoras de colonias.

Realizando la resta del número de UFC obtenidas en el Control de calidad final, al número de UFC obtenidas en el inicial, se registran los siguientes valores (Tabla 32) que indican a simple vista que el método de liofilización involucró procesos de congelamiento y desecación más drásticos que los empleados en el método de secado en discos de agar, ya que como se observa en el control de calidad inicial de la liofilización para el género *Staphylococcus* se obtuvo cerca de 2600 colonias y en el control de calidad final 2200 colonias, es decir se perdió el 15.38% de microorganismos originales, cabe mencionar también que se observa mayor grado de pérdida para el género *Streptococcus*, después para el *Micrococcus* y *Leuconostoc*, y un menor porcentaje de pérdida para el *Staphylococcus*.

Tabla 32.
Relación de la disminución de población en ambos métodos de preservación

GÉNERO	SECADO EN DISCOS DE AGAR	LIOFILIZACIÓN
	PÉRDIDA	
	UFC/ DISCO DE AGAR	UFC/LIOFILIZADO
<i>Staphylococcus</i>	0	4 X 10 ¹² (15.38%)
<i>Streptococcus</i>	1 X 10 ¹² (4.2%)	5 X 10 ¹² (20.83%)
<i>Micrococcus</i>	0	4 X 10 ¹³ (16.67%)
<i>Leuconostoc</i>	0	4 X 10 ¹³ (16.67%)

Cabe mencionar que los resultados obtenidos de las pruebas generales y bioquímicas practicadas a las 70 cepas en estudio, así como las condiciones de preservación y resultados de los controles de calidad inicial, final y mensual, se registraron en el formato diseñado, el cual consta de 4 hojas. Las dos primeras resumen los resultados de características microscópicas, macroscópicas, fisiológicas y bioquímicas del microorganismo, y el cuadro correspondiente a *Otras pruebas* varía dependiendo del género en estudio (el ejemplo que se anexa es para el caso del género *Staphylococcus*), la tercera indica los métodos de preservación practicados, así como los parámetros empleados para su realización, y en la última, se hace mención del número de existencias y distribución de las cepas, es decir, se indica la cantidad existente de ampollitas o viales con discos de agar para cada cepa, así como las bajas de éstas. Dicho formato se anexa a continuación y es importante indicar, que toda la información recabada mediante éstos formatos, se encuentra a su vez, almacenada en la computadora del Cepario de la Facultad de Química, de tal manera que en el momento en que se necesite algún dato presente en los formatos, sólo es necesario indicar el nombre del microorganismo en estudio y se tendrá la información requerida. No se anexan todos los formatos recopilados, debido a que no es el objetivo de ésta tesis.

FORMATO
FICHAS DE IDENTIFICACION
NOMBRE CIENTIFICO

CLAVE

Secado
Liofilización

HOJA
1

Género especie

<i>Características microscópicas</i>	
<i>* Morfología</i>	
• Forma	
• Tamaño	
• Agrupación celular	
• Cápsula	
• Endoesporas	
• Movilidad	
• Otras	
<i>* Reacciones Tintoreales</i>	
• Tinción de Gram	
• Tinción ácido alcohol-resistente	

<i>Características de crecimiento</i>	
<i>* Medio sólido</i>	
• Medio de cultivo	
• Temperatura de incubación	
• Tiempo de incubación	
<i>* Morfología colonial</i>	
• Forma	
• Superficie	
• Borde	
• Elevación	
• Pigmentación	
• Consistencia	
• Opacidad	
• Olor	
<i>* Medio líquido</i>	
• Medio de cultivo	
• Temperatura de incubación	
• Tiempo de incubación	
• Crecimiento en superficie	
• Turbidez	
• Depósito	

Características fisiológicas

• Rangos de temperatura y temp. óptima	
• Relaciones de O ₂	
• Rangos de tolerancia del pH	
• Requerimientos de sal y tolerancia	
• Sensibilidad a antibióticos	

Características bioquímicas

<i>* Enzimas respiratorias</i>		<i>Antes</i>	<i>Después</i>		
• Catalasa					
• Oxidasa					
<i>* Utilización de carbohidratos</i>					
<i>Medio base : Caldo rojo de Fenol</i>					
<i>Carbohidrato</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Carbohidrato</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Adonitol			Maltosa		
Almidón			Manitol		
Arabinosa			Manosa		
Dextrina			Rafinosa		
Dulcitol			Ramnosa		
Eritritol			Ribosa		
Fructosa			Sacarosa		
Galactosa			Salicina		
Glicerol			Sorbitol		
Glucosa			Sorbosa		
Inositol			Trehalosa		
Inulina			Xilosa		
Lactosa			Otros		
<i>* Metabolismo de compuestos nitrogenados</i>					
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>		<i>Antes</i>	<i>Después</i>
• Reducción de nitratos			• Lisina decarboxilasa		
• Indol			• Onitina decarboxilasa		
• Arginina decarboxilasa			• Urea		

Otras pruebas

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
• Crecimiento en agar sangre		
• Patrón de hemólisis		
• Presencia de pigmento		
• Resistencia a la novobiocina		
• Coagulasa		
• VP		
• DNasa		

CARACTERÍSTICAS GENERALES

CLAVE

NOMBRE CIENTIFICO

HOJA

3

Secado

Liofilización

Género especie

Sinónimos u otra designación :	
Fecha de recepción :	Sustrato
Fuente ó procedencia	
País y fecha de aislamiento :	
Otros	

PRESERVACION

Corto plazo :		Largo plazo :	
Medio de Cultivo :		Medio de Cultivo :	
Temperatura y tiempo de incubación :		Temperatura y tiempo de incubación :	
Almacenamiento :		Almacenamiento :	
Duración :		Duración :	

<i>Datos de Secado en discos de agar</i>		<i>Datos de Liofilización</i>		
No. :	Fecha :	No. :	Fecha :	
Medio de propagación :		Medio de propagación :		
Medio de soporte :		Medio de soporte :		
Agentes crioprotectores		Agentes crioprotectores		
T y t de congelación :		T y t de congelación :		
Aparato :		Aparato :		
Secado :		Liofilización :		
Aparato :		Aparato :		
Otros datos		Otros datos .		
<i>Control de Calidad</i>		<i>Control de Calidad</i>		
	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>Antes</i>	<i>Después</i>
Pureza			Pureza	
Viabilidad			Viabilidad	
Otras pruebas			Otras pruebas	
Humedad remanente :			Humedad remanente :	
Otros datos :			Otros datos :	

Observaciones .

Firma

4 ANALISIS DE RESULTADOS

- El conjunto de pruebas bioquímicas practicadas a cada una de las cepas con las que se trabajó, permitieron certificar, identificar, y reclasificar dichas cepas, así como, descartar algunas otras por falta de viabilidad. La certificación se practicó a las cepas presentes en el acervo bacteriano del Cepario de la Facultad de Química, y se denominó certificación, ya que previamente se les había realizado la identificación, y solo se confirmaron los resultados de las pruebas bioquímicas anteriores. La identificación fue para las cepas procedentes del INER, INP, e INNSZ, de las cuáles sólo se conocía su origen. La reclasificación se practicó a dos cepas, una del Género *Streptococcus*, catalogada como *S. zooepidemicus*, y al realizarle las pruebas bioquímicas correspondientes, el patrón de resultados coincidió con las estipuladas para la especie *S. agalactiae*; la otra cepa, corresponde al género *Leuconostoc*, la cual estaba etiquetada con el nombre de *L. citrovorum* DRI-VAC, pero de acuerdo al patrón de resultados corresponde al nombre de *L. paramesenteroides*. Cabe señalar que las cepas correspondientes al género *Micrococcus*, no se reclasificaron, debido a que su patrón de resultados coincidía con el estipulado, lo único que cambiaba era el nombre de acuerdo a la más reciente clasificación de éste género, es decir, las cepas etiquetadas como *M. flavus* y *M. lysodeikticus* son sinónimos del nombre *M. luteus*, por lo tanto presentan los mismos resultados, por ello se determinó no cambiar el nombre, pero en la ficha de identificación correspondiente se mencionan dichos sinónimos. Se descartaron solamente dos cepas, una del género *Staphylococcus* y otra del género *Streptococcus*, debido a que no estuvieron viables. También es importante señalar que se practicaron el menor número posible de pruebas bioquímicas para la identificación de las diferentes especies, ya que en algunos casos no se contaba con los reactivos necesarios. Los resultados antes mencionados de las pruebas generales y bioquímicas de cada una de las cepas en estudio se recolectaron en los formatos diseñados, de tal manera que se actualizó la documentación referente a los cultivos presentes en el acervo bacteriano del Cepario de la Facultad de Química, a la vez que se acrecentó con la adición de las cepas procedentes de instituciones externas. Dichos formatos abarcan la mayor cantidad de características del microorganismo y de pruebas que se les pueden practicar para una identificación rápida y completa.

- La viabilidad, pureza y estabilidad de las cepas preservadas mediante el método de secado en discos de agar durante los primeros tres meses de almacenamiento permanecieron inalterables, obteniéndose un 100% de cepas recuperadas; sin embargo, a partir del cuarto mes dicho porcentaje empezó a disminuir (98.6%), debido a que una de las cepas del género *Micrococcus* presentó disminución en la intensidad del color de su pigmento, el cual originalmente era color rosa, y en los siguientes meses otra cepa del mismo género (*M. lysodeikticus*) presentó también disminución en la intensidad de su pigmento, el cual inicialmente era amarillo canario. Con respecto a la disminución de los porcentajes de estabilidad al 4,5 y 6 mes obtenidos para dos cepas del género *Micrococcus*, se pudo deber a que los viales en los cuales estaban contenidos, presentaban fugas en la tapa lo cual ocasiono la entrada de aire y por ende de humedad al vial, provocando que el microorganismo iniciara lentamente su proceso metabólico dando origen a metabolitos tóxicos, lo que dio lugar posiblemente a variaciones genéticas; las cuales ocasionaron la disminución en la intensidad del pigmento, aunado a las condiciones de "stress" bajo las cuales el microorganismo estaba sujeto, durante el período de almacenamiento. Se propone que las alteraciones en la intensidad del pigmento fueron ocasionadas por variaciones genéticas, debido a que factores como temperatura, medio de cultivo, y aereación, no pudieron influir, ya que la temperatura de almacenaje se mantuvo constante, y la composición del medio de cultivo y aereación, durante su reactivación no fueron modificados^{31, 41}. Cabe mencionar que en la medición de la intensidad del pigmento no se emplearon métodos exactos o aparatos con alta sensibilidad para su medición, si no simples observaciones visuales, sin embargo, se considera que es importante registrar cualquier modificación presente en la morfología colonial de la cepa en estudio, por ello, dicha alteración fue tomada en cuenta como alteración en la estabilidad del microorganismo, pues ello puede ser el principio de un cambio más drástico.
- Al quinto mes el porcentaje volvió a decaer (95.7%), ya que dos cepas, una del género *Staphylococcus* y otra del género *Streptococcus* presentaron contaminaciones. ésto se debió a que los viales dentro de los cuales estaban los discos de agar de tales cepas, no se encontraban perfectamente cerrados, lo que permitió que entrara poco a poco humedad y microorganismos contaminantes del ambiente al vial, de tal manera que al momento en que se activaron los

microorganismos preservados, crecería también el microorganismo contaminante que se introdujo antes o durante la abertura de viales en el control de calidad realizado cada mes, también pudo deberse a que la esterilización de las pinzas con las que se extraía el disco, se realizaba mediante la frotación con torundas de algodón impregnadas con alcohol y un posterior flameo, por lo que posiblemente en tales casos la esterilización no se llevó a cabo correctamente, dejando trazas del disco de agar tomado antes que el de la cepa que resultó contaminada, esto último se induce, ya que las contaminaciones detectadas en el género *Streptococcus*, eran con colonias pertenecientes al género *Staphylococcus*, que fue el primero en activarse, y las contaminaciones presentadas en el género *Staphylococcus*, fueron con las mismas especies de dicho género, específicamente *S. aureus*, es decir, la cepa *S. epidermidis* resulto contaminada con *S. aureus*, cepa activada antes de *S. epidermidis*.

- Al sexto mes el porcentaje disminuyó 3 unidades más (92.8%), ya que otra cepa del género *Streptococcus* presentó contaminación y una más del género *Micrococcus* disminuyó la intensidad de su pigmento. En los siguientes dos meses de almacenamiento el porcentaje de cepas recuperadas no se modificó, ya que no se presentaron alteraciones en la viabilidad, pureza y estabilidad de dichas cepas. De esta manera el porcentaje final de cepas recuperadas fue del 92.8% (65 cepas) con respecto al 100% (70 cepas) de cepas recuperadas del método de liofilización. A simple vista se puede notar que los cultivos preservados por secado presentaron un elevado porcentaje de sobrevivencia (Tabla 13, 14 y 15), lo cual es confirmado a través del análisis estadístico de Distribución Gaussiana (distribución normal) que se le aplicó, cabe señalar que se empleo dicha distribución por que se manejo un número de muestras mayor a 25, pues en caso contrario pudiera haberse empleado la Prueba t de student. Los resultados obtenidos en el análisis estadístico nos indican que no existe diferencia significativa entre los dos métodos de preservación, con respecto al número de cepas recuperadas. Tal resultado era el esperado, ya que los grupos de microorganismos con los que se trabajó, presentan en común, un conjunto de características que posiblemente les confirieron la resistencia necesaria para soportar los procesos drásticos de preservación. Dichas características son:

1. *El tipo de célula*, las bacterias cocoides, las cuales son más resistentes que los bacilos y espirilos, a los cambios drásticos de temperatura, dicha propiedad no se encuentra bien documentada, por lo que se propone que la resistencia a cambios de

temperatura es debida a la simetría en la forma de la célula, es decir, la forma esférica que presentan las bacterias cocoides es simétrica, y permite equilibrar los cambios de presión osmótica y temperatura, así como soportar procesos de desecación, de una manera más rápida en comparación con la forma bacilar y espiral de las demás bacterias que no son simétricas.

2. *El tipo de Gram (gram-positivo)*, esto es, el presentar una pared celular relativamente gruesa, con un mayor contenido de peptidoglucano (20 a 80%) que las bacterias gram-negativas y con numerosos enlaces transversales entre las cadenas de N-acetil-murámico y N-acetil-glucosamina, les confiere mayor resistencia a la desecación, a los cambios bruscos de temperatura y a la exposición a la luz solar. Además la elevada *permeabilidad* de su membrana celular (al ser gram positivos), facilitó la entrada de agentes crioprotectores.^{7, 8, 16}
3. El rango de temperatura y porcentajes de oxígeno bajo los cuales crecen (microorganismos *aerobios* y *mesófilos*), permitió que la técnica a seguir para la preservación, no requiriera de condiciones específicas, como un control ambiental de temperatura o realizarlo bajo condiciones anaeróbicas, lo cual facilitó los pasos a seguir en la técnica.^{7, 16}
- En la composición del medio de soporte empleado en el método de secado en discos de agar, el uso de dos agentes crioprotectores, de diferente naturaleza (proteica: peptona e hidrato de carbono: lactosa), permitió que al combinarse, aumentarían sus efectos de protección, consistentes en: la formación de coloides y una capa gruesa y dura alrededor de cada una de las células, respectivamente, lo que ayudó a que los microorganismos resistieran el proceso de preservación. Dichos mecanismos impidieron la formación de cristales intracelulares y elevación de la presión osmótica (elevación de la concentración de solutos), al disminuir el intervalo de la temperatura de congelación, evitando a la vez una desecación excesiva. Además durante el secado con vacío, las capas de protección formadas alrededor de las células evitaron que se presentara intercambio de nutrientes del medio hacia las células, en aquellas que todavía permanecían activas. También es importante puntualizar la concentración de lactosa empleada, que fue del 7%, la cual evitó la desecación excesiva del microorganismo, permitiendo solamente retener la cantidad mínima necesaria para conservar viable al microorganismo a preservar.^{28, 8, 24}

- El empleo de agar en lugar de gelatina se realizó, debido a que esta última posee ciertas propiedades que impiden que pueda utilizarse de forma universal para todos los microorganismos. Las propiedades son:
 - A. No solidifica totalmente al enfriarse, ello impide que sea almacenada a temperatura ambiente, principalmente si ésta es superior a los 37°C, ya que empieza a hidratarse, por lo que es necesario un control ambiental del lugar donde se almacene
 - B. Es degradada proteolíticamente por una gran cantidad de microorganismos, lo que impide su empleo en microorganismos proteolíticos (aunque no es el caso de los grupos de microorganismos con los que se trabajó). Por el contrario el agar posee una estructura que le confiere una gran estabilidad frente a las enzimas microbianas, ya que, muy pocas bacterias (prácticamente solo algunas bacterias como la *Ps. carragenomora*) son capaces de hidrolizar los enlaces de la molécula de agarosa o agaropectina; esto hace también que al no poder ser rota la molécula por las enzimas microbianas y por ser insoluble en frío, este polisacárido no puede utilizarse por los microorganismos como fuente de carbono, y por tanto actúe solamente como soporte
 - C. Es soluble a temperaturas superiores a los 50°C, esto significa, que a temperaturas inferiores su solubilidad disminuye y hace más difícil su mezcla y homogeneización con la suspensión bacteriana, además se solidifica a temperaturas cercanas a 0°C; en cambio el agar posee una temperatura de gelificación inferior a los 39°C permitiéndolo mezclar en forma líquida con la suspensión celular, sin que ello suponga destrucción de los microorganismos, a la vez que rápidamente se solidifica, impidiendo que el microorganismo empiece a reproducirse. ^{7, 34, 16}
- El equipo diseñado para el secado consistió de un desecador (pyrex) con conexión a vacío, un agente desecante y una bomba de vacío, ésta proporcionaba el flujo de vacío dentro del desecador, permitiendo la extracción rápida de agua, con una potencia de 23 mm. de Hg. Este equipo fue diseñado de esta manera, ya que el objetivo era el realizar un secado rápido, con alta potencia, sin exposiciones al medio ambiente. A pesar de que el mismo objetivo se pudo llevar a cabo si se hubiera empleado el sistema de secado de la liofilizadora, no fue así, ya que el propósito principal de esta tesis es el de proporcionar un método alternativo de preservación de fácil acceso a todo tipo de laboratorio, es decir no se podía emplear equipo o material requerido en el proceso de liofilización, ya que éste requiere de equipo y material especial. Además algunas de las ventajas del equipo diseñado son: 1) no se

presentan fugas en el equipo que provocan el escape de vacío, y por ende pérdida de potencia, y aumento en el tiempo de secado, 2) el proceso de secado se acelera a través del uso de un agente desecante colocado en la parte inferior del desecador

- La técnica efectuada en el secado consistió en el empleo de una bomba de vacío, para el proceso de secado, lo cual permitió reducir el tiempo requerido para el secado, para así disminuir el riesgo de que las células que siguieran activas dieran lugar a la producción de metabolitos secundarios tóxicos para las mismas células, que ocasionaran su muerte, esto significa, que entre menor sea el tiempo de secado, mayor será el porcentaje de viabilidad de las células.^{32, 35}
- El congelamiento previo al secado, favoreció la rapidez de éste último, ya que durante el congelamiento, la mayor cantidad de agua presente en las células y en el medio se separó, deteniéndose en cierta medida el proceso metabólico de las células, a la vez que permitió que la resorción de agua mediante el secado posterior, fuera más efectiva y rápida (evaporación y captura de vapores mediante CaCl_2 y vacío).³²
- La temperatura y la velocidad de congelamiento, que se utilizó minimizó la formación de cristales intracelulares que pudieran dañar la integridad de la célula, ya que el congelamiento se realizó tan rápido que no dio tiempo para que dichos cristales aparecieran.^{37, 36}
- Para el Control de Calidad se realizó la cuenta en placa a cada una de las cepas antes y después de haber sido sometidas al proceso de preservación, para así, determinar el porcentaje de células viables (UFC) resultantes y suponer el período de tiempo que podrían durar almacenadas; esto se realizó sin problema alguno en la liofilización y el secado, pues en el primero se conocía la cantidad de suspensión depositada en cada una de las ampollitas y de ésta se podían realizar las diluciones pertinentes, y en el segundo método se determinó por disco de agar. Con respecto al número de UFC resultantes para la liofilización, se observa que durante el proceso muere un mayor número de microorganismos, en comparación con el secado en el cual la reducción de microorganismo es menor, pues en este último sólo se presentó disminución para el género *Streptococcus*, no así para la liofilización en la que para los cuatro géneros se presentaron reducción en el número de microorganismos, observándose un mayor grado de pérdida para el género *Streptococcus*, y un menor porcentaje de pérdida para el género *Staphylococcus*, lo cual se comprende debido a que el primero es considerado como uno de los géneros más delicados y exigentes,

pues es muy sensible a procesos que involucran desecación o congelamiento no así el segundo que presenta como característica particular una alta resistencia a los procesos de desecación. Dichos resultados nos indican que el proceso de liofilización resultó ser más drástico que el de secado.

- En la comparación de los métodos de preservación empleados se observó que estadísticamente ambos métodos no presentan diferencia significativa, con respecto al número de cepas recuperadas, no así, en lo referente a la técnica y equipo empleado. En lo que respecta a la técnica ambos incluyen un congelamiento previo al secado, sin embargo la forma de eliminar el agua es diferente, ya que la liofilización involucra un proceso de sublimación al alto vacío, mientras que el secado involucra evaporación del agua y extracción de ésta mediante vacío y un agente desecante, además de que el tiempo de secado es superior para el método de secado en discos de agar, pero ello no ocasiona alteraciones en la estabilidad del cultivo. En lo referente a equipo empleado, para la liofilización se requiere de un aparato sofisticado denominado liofilizador, el cual se encuentra en un número reducido de laboratorios, dado su elevado costo en precio y mantenimiento, lo cual no ocurre con el secado, en el que sólo se emplea un desecador con conexión a vacío y una bomba de vacío, los cuales son fáciles de conseguir en cualquier laboratorio; además el material de vidrio requerido como es el caso de ampollitas para la liofilización, deben de ser de un material en especial y de un grosor determinado, no así para el secado que requiere solo de cajas Petri de vidrio, pipetas Pasteur y de viales para el almacenamiento de los discos secos, materiales que encontramos fácilmente en el laboratorio.
- Finalmente es importante mencionar que la liofilización presenta una serie de etapas críticas, que si en un momento dado llegan a fallar, provocan que todo el trabajo realizado sea inútil, ya que se pueden originar alteraciones en la estabilidad del microorganismo, disminuir el porcentaje de viabilidad de la cepa y en el más crítico de los casos la cepa a preservar se pierde. Por ello es factible la aplicación de un método de preservación alternativo, es decir que se cuente con dos métodos para preservar un mismo grupo de microorganismos, lo cual permite reforzar el período de almacenaje de dichos microorganismo, ya que si alguno de los métodos comienza a tener fallas y a provocar cambios morfológicos, fisiológicos o bioquímicos en la cepa preservada, se cuenta con el otro método, para recuperarla con sus características originales. Cabe mencionar que para lograr todo esto y detectar cualquier cambio en

las cepas, es indispensable contar un riguroso control de calidad periódico de las cepas preservadas, es decir, realizarles pruebas de pureza, viabilidad y estabilidad cada cierto tiempo (por ejemplo cada seis meses), registrar los datos y descartar aquellos microorganismos que no cumplan con lo registrado originalmente y volver a preservarlos, cuidando cada una de las etapas a seguir en el proceso, para determinar cual fue la causa de que se presentaran alteraciones en su morfología, fisiología o características bioquímicas. En el caso de este trabajo, el control de calidad solamente se realizó cada mes a lo largo de ocho meses, pero es necesario hacer las pruebas a los cuatro meses siguientes y así sucesivamente para determinar el período de tiempo máximo que puede ser almacenadas las cepas bajo este método.

5 CONCLUSIONES

- Se preservó mediante secado en discos de agar una colección de cocos gram positivos, que incluyen 4 géneros, 23 especies, 4 variedades y 3 biotipos.
- Se realizaron 47 certificaciones, 21 identificaciones, 2 reclasificaciones y dos eliminaciones por falta de viabilidad.
- Se formó un registro completo de cada una de las cepas en estudio, que incluye, características microscópicas, macroscópicas, fisiológicas y bioquímicas, así como datos de los métodos de preservación aplicados y un control de existencias y distribución.
- El secado en discos de agar es un método de preservación adecuado para preservar *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* y *Leuconostoc*, durante ocho meses.
- La pureza, viabilidad y estabilidad, de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* y *Leuconostoc*, después del proceso de preservación se mantuvo en óptimas condiciones, obteniéndose al cabo de dicho tiempo un porcentaje del 92.8% (65 cepas) de cepas recuperadas.
- Estadísticamente no existe diferencia significativa entre el método de secado en discos de agar y el de liofilización, con respecto al número de cepas recuperadas, con un almacenaje de hasta 8 meses.
- El control de calidad de la liofilización y el de secado, indicó que el primero provocó una mayor reducción del número de microorganismos durante el proceso de preservación.

- Las ventajas del secado en discos de agar, con respecto a la liofilización son:
 - 1) Bajo costo
 - 2) Material y equipo a utilizar accesible a cualquier tipo de laboratorio.
 - 3) Técnica sencilla
 - 4) No requiere personal especializado.
 - 5) Un solo frasco (con 30 o 40 discos) equivale aproximadamente a 30 o 40 ampolletas.

- La aplicación de dos métodos de preservación a un mismo grupo de microorganismos, representa una mayor seguridad con respecto al período de tiempo de almacenaje, esto significa, que no se depende solamente de un método para su preservación, sino que se cuenta con otra alternativa, en caso de que alguno comience a inducir alteraciones en las características originales de la cepa.

- El bajo costo requerido en el secado en discos de agar, aunado al uso continuo de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, y *Leuconostoc*, en la docencia e investigación, permiten que dicho método sea accesible a laboratorios pequeños que no cuentan con la infraestructura y recursos económicos necesarios, como es el caso del Cepario de la Facultad de Química.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Atlas, Ronald M. **Microbiología, Fundamentos y Aplicaciones**, Compañía Editorial Continental, México, 1990. p.p. 78-99, 330-331
2. Bartlett, Raymond C. **Medical Microbiology. Quality Cost and Clinical Relevance**, Editorial John Wiley and Sons., USA, 1974. p.p. 227-238.
3. Boyd, T. Robert and G. Haerl, Bryan. **Microbiología Médica**, Editorial El Ateneo, Argentina, 1981. p.p. 37,91
4. Brock, D. Thomas. **Biology of Microorganisms**, Editorial Prentice Hall, Nueva Jersey, 1991, p.p. 9-13
5. Chang, L. T. and R. P., Elander. **Long - term Preservation of Industrially Important Microorganisms**. In L. Demain, Arnold and A. Solomon, Nadine. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1986. Capítulo 5. p.p. 49-54
6. Cohan, Frederick M. **Genetic exchange and evolutionary divergence in prokaryotes**. In *Elsevier Science*, Vol. 9, No 5, Mayo 1994. p.p. 175-180.
7. Collins, C. H. and M. Lynés, Patricia. **Microbiological Methods**, Editorial Butterworth Heinemann, 6ª. Edición, London, 1989. p.p. 89-91
8. Dirce, M. V., Yano, M. Giuliana Farris y cols. **Técnicas para cultivo, identificação e Preservacao de bactérias**. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas, 1993. p.p.1-18
9. Facklam, Richard and B. Carey, Roberta. **Streptococci and Aerococci**. In Lennette H., Edwin, **Manual of Clinical Microbiology**, American Society for Microbiology, USA, 1985. Sección III, *Aerobic bacteria*. p.p. 154-170

10. Facklam, R. Richard and Washington, A. John. ***Streptococcus and Related Catalase-Negative Gram-Positive Cocci***. In Balows, Albert and Hausler, J. William. ***Manual of Clinical Microbiology***, American Society for Microbiology, 5ª. Edición, USA, 1991. Capítulo 28, p.p. 238-254
11. Fey, Hans. ***Compendio de Bacteriología General Médica***, Editorial Acribia, España, 1983. p.p. 6,41-45
12. Frobisher, Hinsdill, Crabtree Goodheart. ***Fundamentals of Microbiology***, Editorial W. B. Saunders Company, 9ª. Edición, USA, 1974. p.p. 279-284
13. García, Rafael. ***Staphylococcus***. In Tay Zavala, Jorge. ***Microbiología y Parasitología Médicas***, Editorial Méndez Editores, 2ª. Edición, México, 1995. p.p. 1.194-1.202
14. Giono Cerezo, Silvia. ***Streptococcus***. In Tay Zavala, Jorge. ***Microbiología y Parasitología Médicas***, Editorial Méndez Editores, 2ª. Edición, México, 1995. p.p. 1.203-1.213
15. Giono Cerezo, Silvia y Morales Tepatl, Edmundo. ***Catálogo de Cepas***, Publicaciones IPN, México, 1985. p.p. 1-14
16. Hawker, E. L. ***Elementos de Microbiología General. Introducción a la Biología de los Microorganismos***, Editorial Acribia, España, 1964. p.p. 278-291
17. Heinz, Karl and Schleifer. ***Gram - Positive Cocci***. In S. Mair, Nicholas, H., Peter and A., Sneath. ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***, Editorial Williams and Wilkins, 9ª. Edición, USA, 1986. Vol. 2, Sección 12. p.p. 999-1075
18. Isaac, Susan and Jennings, David. ***Microbial Culture***, Editorial Bios-Scientific-Publishers, Oxford, UK, 1995. p.p. 115-120

19. Kirshop, B. E. and A. Doyle. *Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells (A Manual of Laboratory Methods)*, Academic Press, 2ª. Edición, Gran Bretaña, 1991. p.p. 1-51, 121-132
20. Kirshop, B. E. and J.J., S. Snell. *Maintenance of microorganisms (A Manual of Laboratory Methods)*, Academic Press, USA, 1984. p.p. 1-46
21. Kloos, E. W. And Lambe, W. D. *Staphylococcus*. In Balows, Albert and Hausler, J. William. *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, 5ª. Edición, USA, 1991. Capítulo 28, p.p. 222-230
22. Kloos, E. W. and J.H., Jorgensen. *Staphylococci*. In Lennette H., Edwin, *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, USA, 1985. Sección III, Aerobic bacteria. p.p. 143-151
23. Koneman, E. W. *Diagnóstico Microbiológico (Texto y Atlas a color)*, Editorial Médica Panamericana, 3ª. Edición, Argentina, 1992. p.p. 413-449
24. Lapage, S.P., J.E. Shelton, T.G. Mitchell, and A.R. Mackenzie. *Culture Collections and the preservation of bacteria*. In J.R., Norris and D.W. Ribbons (de.). *Methods in Microbiology*, Academic Press, London, 1975. Vol.3, p.p. 135-228
25. Levin, Bruce R. *The Maintenance of Genetic Variation in Bacterial Populations*. In Chf. Sing & C. L. Haris. *Genetics of Celulas, Individual Family & Population Variability*, Oxford University Press, Nueva York, 1993. p.p. 193-200
26. Mac Faddin, Jean. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, Editorial Médica Panamericana, México, 1993. p.p.39-44, 50-60, 61-71, 142-148, 154-160, 183-198
27. Madigan, T. Michael and Marris, L. Barry. *Extremophiles*. In *Scientific American*, Vol. 276, No. 4, Abril de 1997.

28. Muro, M. A. e R. Luchi. Márcia. *Preservacao de Microorganismos*, Fundacao Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas, 1989. p.p. 1-65
29. Murray, Patrick, Jo Baron, Ellen and cols.. *Manual of Clinical Microbiology*, Editorial ASM Press, 6ª. Edición, Washington, D.C., 1995. p.p. 158-162
30. Murray, Patrick and cols.. *Microbiología Médica*, Editorial Hacourt Brace de España, 2ª. Edición, España, 1997. Cap. 19 *Staphylococcus*, Cap. 20 *Streptococcus y bacterias gram positivas relacionadas*. p.p. 166-178, 180-198.
31. Piatkin, D.R. y S. Krivoshein, Yu. *Microbiología*, Editorial MIR, 2ª Edición, URSS, 1981. p.p. 74-80.
32. Salle A., J. *Fundamental Principles of Bacteriology*, Editorial Mc. Graw-Hill, 7ª. Edición, New Delhi, 1974 Cap. 10 *Effect of environment upon Bacteria*. p.p. 315-323
33. Sánchez Marroquín, A. *Principios de Microbiología Industrial*, Editorial Química S. A., México, 1970. p.p. 305-307.
34. Senez, J. C. *Microbiología General*, Editorial Alhambra, España, 1976. p.p. 189-191
35. Sikyta, B. *Progress in Industrial Microbiology. Techniques in Applied Microbiology*. Editorial Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1990, Vol. 31. p.p. 326-330
36. Simione, P. F. and E. M. Brown. *ATCC Preservation Methods : Freezing and Freeze - drying*, Publication ATCC, 2ª. Edición, USA, 1991. p.p. 1-21
37. Singleton, Paul and Sainsbury, Diana. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, Editorial John Wiley and Sons, 2ª. Edición, Gran Bretaña, 1991. p.p. 266, 367-369

38. Sonnenwirth, Alex C. *Cocos gram positivos y gram negativos*. In Sonnenwirth, C. and Jarett, Leonard. *Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico*, Editorial Médica Panamericana, Argentina, 1986. p.p. 1500-1531
39. Souza, Hiroshi. *Freeze - Drying of Microorganisms*. Hokkaido University. In Lederberg, Joshua. *Encyclopedia of Microbiology*, Academic Press, New York, 1992. Vol. 2. p.p. 231-243
40. Spiegel R., Murray. *Probabilidad y Estadística*, Editorial Mc Graw-Hill, México, 1995.p.p. 108-142
41. Steel, J. K. and Cowan, S.T.. *Manual para la identificación de bacterias de importancia médica*, Compañía Editorial Continental, 2ª. Edición, México, 1980. P.p. 67-68
42. Sybil, P. Parker. *Diccionario de Química*, Mc. Graw Hill, México, 1991. Tomo I, A-M. p.p.122, 140

7 ANEXOS

Anexo 1

Medios de Cultivo

Fórmulas aproximadas en gramos por litro de agua destilada.

Arginina caldo de (de Falkow)

D (+)-glucosa	1.0
Peptona	5.0
Extracto de levadura	3.0
Arginina monohidrociorada	5.0
Púrpura de bromocresol	0.02
pH final: 6.8 ± 0.2	

Preparación:

Se disuelven los componentes de este medio en un litro de agua destilada. Se distribuye en tubos y se esteriliza a 121°C, 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se somete a prueba de esterilidad.

Bilis Esculina Agar

Peptona	5.0
Extracto de carne	3.0
Bilis de buey	40.0
Esculina	1.0
Citrato de hierro ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	0.5
Agar	15.0
pH final : $6.6. \pm 0.2$	

Preparación:

Disolver 64 gramos en un litro de agua destilada y calentar hasta ebullición. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave.

DNAsa Agar

Triptosa	20.0
Acido desoxirribonucleico	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	12.0

pH final . 7.3 \pm 0.2

Preparación:

Suspender 30 gramos en un litro de agua destilada y calentar hasta ebullición. Esterilizar a 121°C, durante 15 minutos. Una variante de la preparación es adicionar o-toluidina (1 gramo por cada 100 ml de medio que se prepare) como indicador, ajustar el pH, y posteriormente someter a esterilización.

Infusión cerebro corazón agar

Infusión de cerebro de temera	200.0
Infusión cerebro de res	250.0
Mezcla de peptonas	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5
Dextrosa	2.0
Agar	15.0

pH final : 7.4 \pm 0,2

Preparación:

Se hace una suspensión con 52 gramos de material deshidratado en un litro de agua destilada, se mezcla bien y se calienta agitando frecuentemente hasta ebullición, manteniendo así durante 1 minuto. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121°C, 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se somete a prueba de esterilidad.

Infusión Cerebro Corazón Caldo

Composición igual al anterior, sólo que sin agar.

Preparación:

Disolver 37 gramos en un litro de agua destilada. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb. de presión, durante 15 minutos.

Hipurato de sodio caldo de

Hipurato de sodio	10.0
Caldo de infusión cerebro corazón	1000 ml

Preparación:

Se disuelve la sal en el caldo y posteriormente se esteriliza a 15 lb de presión y a 121°C por 15 minutos. Se realiza prueba de esterilidad al medio. Una vez preparado el medio debe marcarse el nivel de este en el tubo que lo contiene, pues durante el almacenamiento e incubación del medio puede ocurrir la evaporación de éste, cambiando así la concentración del hipurato, pudiendo dar falsos positivos. Por ello se recomienda checar el nivel del medio antes de utilizarlo y de ser necesario nivelarlo con agua destilada.

Leche descremada

Preparación.

Se disuelven 100 gramos en un litro de agua destilada . Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 118°C, durante 30 minutos. Se somete a prueba de esterilidad

Medio MIO

Extracto de levadura	3.0
Peptona de gelatina	10.0
Peptona de caseína	10.0
L-ornitina	5.0
Dextrosa	1.0
Agar	2.0
Púrpura de bromocresol	0.02

pH final . 6.5 \pm 0.2

Preparación:

Disolver 31 gramos en un litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición durante un minuto, hasta disolverse completamente. Colocar en tubos de 13X100, con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb de presión, durante 15 minutos.

Nitratos Caldo

Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Nitrato de potasio	1.0

Preparación.

Pesar las cantidades indicadas, y disolverlas en un litro de agua destilada. Calentar suavemente hasta ebullición. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave.

Rojo de Fenol Base de Caldo (Medio Base para Carbohidratos)

Peptona de caseína	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo de Fenol	0.018

pH final . 7.4 \pm 0.2

Preparación:

Se disuelven 15 gramos en un litro de agua destilada, agregándole de 5 a 10 gramos del carbohidrato a probar, dependiendo de la concentración final deseada de éste. Esterilizar de 116 a 118°C, a no más de 12 lb de presión, durante 15 minutos.

Rojo de Fenol y Dextrosa Caldo

Peptona de caseína	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Dextrosa	5.0
Rojo de fenol	0.018

pH final : 7.4

Preparación:

Disolver 20 gramos en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave, de 116 a 118°C, a no más de 12 lb de presión, durante 15 minutos.

Rojo de fenol y Lactosa Caldo

Peptona de caseína	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo de Fenol	0.018
Lactosa	5.0

pH final : 7.4 ± 0.2

Preparación:

Disolver 20 gramos en un litro de agua destilada. Esterilizar de 116 a 118°C, a no más de 12 lb de presión, durante 15 minutos.

Rojo de Fenol y Manitol Caldo

Peptona de caseína	10.0
Cloruro de sodio	5.0

Rojo de Fenol	0 018
Manitol	5.0

pH final : 7.4 ± 0.2

Preparación:

Se disuelven 20 gramos en un litro de agua destilada. Esterilizar de 116 a 118°C, a no más de 12 lb de presión, durante 15 minutos. No sobrecalentar.

Rojo de Fenol y Sacarosa Caldo

Peptona de caseína	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo de fenol	0.018
Sacarosa	5.0

pH final : 7.4 ± 0.2

Preparación:

Se disuelven los componentes de este medio en un litro de agua destilada. Se distribuye en tubos y se esteriliza a 121°C, 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se somete a prueba de esterilidad.

Nutritivo Agar

Peptona de gelatina	5.0
Extracto de carne de res	3.0
Agar	15.0

pH final : 6.8 ± 0.2

Preparación:

Se suspenden 23 gramos en un litro de agua destilada. Mezclar suavemente y calentar con agitación constante, hasta ebullición, durante 1 o 2 minutos, o hasta disolución completa. Distribuir en tubos y esterilizar a 121°C, durante 15 minutos.

Nutritivo Caldo

Peptona de carne	5.0
Extracto de carne	3.0
pH final : 7.0 ± 0.2	

Preparación:

Se disuelven 8 gramos del polvo en un litro de agua destilada. Si es necesario se calienta suavemente para disolverlo. Se distribuye en tubos y se esteriliza a 121°C, 15 lb de presión, durante 15 minutos. Se somete a prueba de esterilidad.

Sangre base de agar

Extracto de levadura	5.0
Infusión de músculo cardíaco	2.0
Peptona de caseína	13.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
Eritrocitos de carnero del 8 al 10%	
pH final 7.3 ± 0.2	

Preparación:

Se hace una suspensión con 24 gramos del polvo en 550 ml de agua destilada. Se deja reposar durante 5 minutos y se mezcla hasta obtener una suspensión uniforme. Se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante un minuto. Una vez fundido el medio se le añade un agitador magnético. Se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos.

El agar esterilizado se deja enfriar hasta que alcance una temperatura de 45°C, para entonces añadir el contenido de un frasco de sangre desfibrinada estéril al 10% (50 ml) a la vez que se hace rotar suavemente (con la ayuda de una parrilla) hasta que la sangre esté uniformemente mezclada con el medio. Después se vacía a cajas de Petri estériles.

Solución salina isotónica

Cloruro de sodio 0.85

pH final: 7.0

Preparación:

Se disuelve la sal en 100 ml de agua destilada, agitando y una vez disuelta, se distribuye y esteriliza en autoclave a 121°C, a 15 lb de presión, durante 15 minutos.

Soporte Medio de

Agar Nutritivo 2.3

Neopeptona 5.0

Lactosa 7.0

pH final : 7.0 \pm 0.2

Preparación:

Disolver las cantidades indicadas en 100 ml. de agua destilada. Calentar ligeramente con agitación constante y suave, hasta disolución completa de los ingredientes. Distribuir en tubos de 16X150 con tapón de rosca Esterilizar en autoclave, de 116 a 118°C, 15 lb de presión, durante 15 minutos

Urea (de Crietsensen) Caldo

Peptona 1.0

Cloruro de sodio 5.0

KH₂PO₄ 2.0

Glucosa 1.0

Urea 2.0

Rojo de fenol 0.012

pH: 6.8

Preparación:

Pesar las cantidades indicadas y disolverlas en un litro de agua destilada. Esterilizar por filtración (Método del filtro de membrana Millipore, diámetro del poro de 0.45 micras). Distribuir en tubos en tubos estériles. Someter a prueba de esterilidad.

NOTA: en el caso de algunos agares, no se distribuyeron en tubos de ensaye, sino en cajas, para los cuales se esterizaron en un matraz y posteriormente se vaciaron en cajas Petri dentro de una campana de flujo laminar. Posteriormente se sometieron a prueba de esterilidad.

Anexo 2

Reactivos

Reactivos de Tinciones

1.- Tinción de Gram

Solución de cristal violeta oxalato de amonio

Solución yodo-yodurada de lugol

Agente decolorante

Colorante de contraste

- Solución de cristal violeta oxalato de amonio:

Solución 1 : se disuelven 2 gramos de cristal violeta en 20 ml de alcohol etílico al 95%.

Solución 2 : se disuelven 0.8 gramos de oxalato de amonio en 80 ml de agua destilada.

Dejar la solución 2 en reposo durante una noche o calentar débilmente hasta que se solubilice. Después mezclar con la solución 1 y someter a filtración.

- Solución yodo-yodurada de lugol:

En un mortero mezclar 1 gramo de yodo y 2 gramos de yoduro de potasio, molerlo finamente, agregar una pequeña cantidad de agua para lavar el material, aforar a 300 ml y agitar vigorosamente. Guardar la solución resultante en un frasco ámbar.

- Agente decolorante:

Se mezclan 250 ml de alcohol etílico al 95% con 250 ml de acetona.

- Colorante de contraste (Solución diluida de safranina):

Se disuelven 2.5 gramos de safranina en 100 ml de alcohol etílico al 95%.

Posteriormente se mezclan 25 ml de esta solución con 75 ml de agua destilada. Filtrar la solución.

Reactivos para las pruebas de hidrólisis

1) Hidrólisis de hipurato

Cloruro férrico	12.0 g
Acido clorhídrico	2.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

Se pesan las cantidades indicadas, y se disuelven en la cantidad indicada de agua destilada, la solución que se obtiene se guarda en refrigeración

2) Prueba de la catalasa

Peróxido de hidrógeno	30.00 ml
Agua destilada	100.0 ml

Se mide la cantidad indicada de peróxido de hidrógeno y se mezcla perfectamente con el agua destilada.

3) Prueba de la oxidasa

Reactivo de Kovacs :

Diclorhidrato de tetrametil -p- fenilendiamina al 1%

Disolver 1 gramo de reactivo en 100 ml de agua destilada ó 0.1 gramo en 10 ml dependiendo de la cantidad de reactivo a utilizar. Debe prepararse minutos antes de utilizarse.

4) Producción de acetoina

Alfa - naftol	5.0 g
Hidróxido de potasio	40.0 g
Etanol	100 ml
Agua destilada	100 ml

Se prepara una solución etanólica al 5% de alfa-naftol (no usar después de 48 horas) y una solución al 40% de hidróxido de potasio

5) Reducción de nitratos

Acido sulfanilico	8.0 g
Alfa-naftilamina	5.0 g
Acido acético 5N, 30%	2000.0 ml

Reactivo 1 : se disuelven 8 gramos de ácido sulfanilico en 1000 ml de ácido acético 5N.

Reactivo 2 : se disuelven 5 gramos de alfa-naftilamina en 1000 ml de ácido acético 5N.