

870127  
12  
20j

# Universidad Autónoma de Guadalajara

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



**AISLAMIENTO DEL GENERO *Lactobacillus* EN HECES  
Y SU SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS  
DE USO ORAL.**

**FALLA DE ORIGEN**

## **TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

**P R E S E N T A :**

**ELIAS ABELARDO MACIAS RODRIGO**

Asesor: Q.F.B. MA. Del SOCORRO PULIDO G.

GUADALAJARA, JAL.

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE

	PAG
DEDICATORIAS	
CAPITULO I	
INTRODUCCION -----	1
CAPITULO II	
GENERALIDADES -----	9
CAPITULO III	
MATERIAL Y METODOS -----	26
CAPITULO IV	
RESULTADOS -----	58
CAPITULO V	
CONCLUSIONES Y/O COMENTARIOS -----	68
CAPITULO VI	
BIBLIOGRAFIA -----	71

**CAPITULO 1**

**I N T R O D U C C I O N**

La significación de la flora intestinal ha sido motivo de controversia desde el tiempo de Pasteur. Se han planteado cuestiones sobre si los microorganismos son esenciales para la vida; si son un inconveniente natural e inevitable, o una ventaja, aunque no indispensables. Los estudios de Pasteur sobre fermentaciones microbianas hicieron pensar que los microorganismos intestinales tal vez jugaran un papel esencial en el metabolismo de las sustancias alimenticias. Metchnikoff sugirió que algunos organismos intestinales eran útiles y otros perjudiciales, atribuyendo la larga vida de los campesinos de Bulgaria al consumo de manteca de leche que contenía L. bulgaricus.

El tubo digestivo del hombre y de la mayor parte de los animales y los microorganismos que los pueblan representan un ecosistema particularmente complejo. En este ecosistema existe en cada instante un equilibrio dinámico entre los constituyentes bióticos: microorganismos y células de la pared gastrointestinal y los constituyentes abióticos: todas las sustancias químicas que componen el bolo alimenticio. Las interacciones que condicionan este equilibrio son múltiples y se integran estrechamente los unos a los otros. Estas son en particular fuertemente dependientes del régimen alimentario del huésped.

El intestino alberga un número enorme de bacterias -- (  $10^{14}$  ) y de especies microbianas (mayor de 300), en su gran mayoría en el intestino grueso. Las bacterias residentes se encuentran por lo general adheridas a las células epiteliales de la mucosa, en nichos ecológicos a lo largo del tubo intestinal, donde se multiplican permanentemente. Además, existe una abundante flora transeunte que procede del medio ambiente, de la alimentación o de tramos superiores del tubo digestivo, y se encuentra libre en la luz intestinal o asociada con partículas y restos alimentarios. Transita pasivamente y en condiciones normales es incapaz de fijarse y establecerse, y es eliminada al exterior.

Las condiciones ecológicas varían a lo largo del tubo digestivo, el cual puede considerarse constituido por una serie de biotipos, cada uno de los cuales contiene una flora característica. Hay que destacar la disminución progresiva de la tensión de oxígeno y del potencial de oxidoreducción a lo largo del tubo digestivo, la acidez del jugo gástrico, el peristaltismo intestinal y la presencia de diversos nutrientes y sustancias inhibitorias.

En el esófago existen bacterias en pequeño número -- (  $10^4$ /ml ), en su mayoría procedentes de los alimentos y -

de las secreciones de la boca y faringe.

El estómago presenta características especiales, como consecuencia de la acidez de la secreción gástrica (PH 2-3) y de la presencia de oxígeno aportado por la deglución. - Por ello, la flora es escasa ( $10^3$ /ml) y está constituida - por anaerobios facultativos resistentes a la acidez, pertenecientes a los géneros Lactobacillus, Streptococcus y algunas levaduras. Los lactobacilos se fijan a las células del epitelio escamoso y las levaduras, en las células del epitelio secretor.

El estómago constituye una barrera que regula la entrada de microorganismos en el tubo intestinal, especialmente de los patógenos, a no ser que resistan la acidez, - como las micobacterias. Sin embargo, cuando ésta disminuye por cualquier causa, puede modificarse esta función de barrera y aumentar la flora.

En el duodeno y primeros tramos del intestino delgado (yeyuno), existe una flora escasa ( $10^4$ - $10^5$ /ml), muy semejante a la del estómago integrada fundamentalmente por bacterias grampositivas anaerobias facultativas y levaduras - (Lactobacillus, Streptococcus, Corynebacterium, Candida). Más adelante, al disminuir la acidez y el peristaltismo, -

el número de bacterias aumenta progresivamente, empiezan a aparecer anaerobios y bacterias libres en el contenido intestinal y al final del íleon existe un número semejante - de aerobios y anaerobios, cuya composición se hace más parecida a la del colon.

La escasez de la flora en el intestino delgado no parece debida a la bilis, sino más bien al tránsito rápido - como consecuencia del peristaltismo intestinal. Mientras que la derivación de la bilis altera poco la flora, las modificaciones del peristaltismo la aumentan rápidamente; - ocurre en las zonas de tránsito más lento, como la extremidad del íleon (  $10^6$  ) ó cuando existen divertículos.

Por otra parte, el aumento en la cantidad de bilis - por procesos obstructivos altos, aún cuando no modifica mucho el número de bacterias, actúa como un factor selectivo y estimula el desarrollo de las especies resistentes, como S. faecalis, Proteus, S. perfringens y B. fragilis.

En el intestino grueso, el número de bacterias aumenta extraordinariamente debido a la presencia de residuos - no absorbibles procedentes de los alimentos (celulosa, aditivos) y del propio organismo (moco, restos celulares, secreción biliar), y puede considerarse como un tanque de -



fermentación.

La flora bacteriana es enorme ( $10^{11}$ - $10^{12}$ /ml) y muy variada y está compuesta por anaerobios no esporulados - - (más del 90%), que pueden ser bacilos gramnegativos (Bacteroides, Fusobacterium), que son los más abundantes, cocos grampositivos (Peptococcus, Peptostreptococcus) y bacilos grampositivos (Eubacterium, Bifidobacterium), con algunos bacilos grampositivos esporulados (C. perfringens).- Los anaerobios facultativos se encuentran en mucho menor número (0.1-10%) y están constituidos por S. faecalis, S. aureus, Lactobacillus, enterobacterias (E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Proteus) y Pseudomonas. Además, - hay que añadir la presencia de hongos (Candida), a veces - de protozoos (amebas y flagelados intestinales) o virus - (rotavirus, enterovirus, adenovirus).

La flora de las heces es enorme, pues representa el 40% de su peso. Contiene en general todas las bacterias - del tubo digestivo, pero no en la misma proporción, y su - composición es muy parecida a la del colon. Por la facilidad en la obtención de muestras es la flora mejor estudiada, pero no constituye un reflejo fidedigno de lo que ocurre en el tubo digestivo, especialmente de las partes altas.

Su composición está relacionada con la dieta, pues se ha observado que la dieta hiperproteica típica de los países desarrollados condiciona un mayor desarrollo de anaerobios estrictos en el intestino grueso, y se ha sugerido -- que la actividad metabólica de esta flora estaría relacionada con una mayor incidencia de cáncer de colon. Por el contrario, en los países con dieta hidrocarbonada, la flora del intestino delgado es más abundante (x 100), incluidas especies aerobias y anaerobias.

Teniendo en cuenta la importancia de la flora intestinal, especialmente de la anaerobia, y la gran cantidad de enzimas y productos que vierten al tracto digestivo, es evidente que su existencia influye en la anatomía y fisiología del tubo digestivo (peristaltismo), en la nutrición (vitaminas), en el desarrollo del sistema inmunitario local (placas de Peyer, IgA secretora) y en la acción de barrera evitando o dificultando el establecimiento (adherencia, multiplicación) de los patógenos (Salmonella, Shigella, V. cholerae), especialmente cuando llegan en pequeño número.

Dentro de los primeros 2 a 3 días después del nacimiento el canal alimenticio de los bebés es colonizado por lactobacilos, probablemente derivados de la vagina, boca e

intestino materno. Cuando el niño crece y cambia su dieta, la composición de la flora intestinal cambia también, aproximándose últimamente a la del adulto.

Los microorganismos pertenecientes al género Lactobacillus se consideran comensales del tracto gastrointestinal, de tal forma que su presencia en estómago, intestino delgado o intestino grueso, aunque su número no sea tan elevado como el de otras bacterias, ejercen junto con otra flora comensal a este nivel un importante papel fisiológico y aseguran una protección eficaz contra las bacterias potencialmente patógenas. Se comprende pues que ante una medicación antibacteriana es posible la aparición de una patología más o menos trascendente debida a la atenuación o destrucción de esta flora intestinal normal del individuo tratado. Esto conlleva evidentemente que las bacterias más sensibles sean destruidas antes y que las resistentes crezcan con más facilidad pues desaparece el antagonismo que mantiene el equilibrio bacteriano. Estas alteraciones pueden traducirse en la implantación de otra flora que actúa inhibiendo las funciones enzimáticas o que estas mismas se debiliten al destruirse las bacterias que intervienen en la síntesis de vitaminas y proteínas; en la exaltación de la virulencia de bacterias comensales resistentes; en la pérdida de una barrera mecánica a microorganismos

mos patógenos, etc.

La alteración de la flora intestinal será mayor cuando la eliminación fecal sea más intensa, la duración del tratamiento sea más prolongada, las dosis mayores, el espectro bacteriano más amplio y la vía de administración oral.

Estos hechos han motivado la realización de este trabajo en el cual su objetivo principal es investigar de forma cualitativa las especies del género Lactobacillus presentes en las heces, determinando las que están presentes a este nivel y su frecuencia, así como su sensibilidad a los antimicrobianos de uso oral, para así valorar el riesgo de destrucción de esta importante flora y determinar si alguna de ellas por su especial resistencia sería la más recomendable para su administración profiláctica.

CAPITULO II

GENERALIDADES.

El género Lactobacillus está constituido por bacilos-grampositivos que varían su forma desde cortos y gruesos, aislados, en cadenas o dispuestos en empalizadas, hasta -- largos y finos, aislados o en cadenas. Inmóviles, no esporulados y no capsulados.

Sus requerimientos nutricionales son complejos y variados, ya que no crecen bien en medios usuales que contengan peptonas y extracto de carne, en cambio requieren vitaminas contenidas en vegetales o jugos de frutas, extracto de levadura, suero o leche, así como  $CO_2$  y carbohidratos como fuente de carbono y energía. Algunos utilizan sales de amonio como fuente de nitrógeno, y de ellas sintetizan las proteínas y aminoácidos necesarios. Los ácidos grasos no saturados, particularmente los presentes en el Tween 80 (monoleato de sorbitan) tienen un efecto estimulante en el crecimiento.

Los lactobacilos crecen mejor en un PH cercano a 6.0, aunque son capaces de sobrevivir y crecer lentamente a valores de PH tan bajos como 3.0 a 4.0. Esta característica lleva a la utilización de medios ácidos para el cultivo selectivo de esta bacteria de saliva, heces, y otros materiales conteniendo una mezcla de bacterias capaces de crecer más en medios ordinarios. El agar jugo de tomate, el me-

dio de Man-Rogosa-Mitchell, el caldo de Rogosa-Mitchell - Wiseman y el caldo microinoculación son buenos medios selectivos para el cultivo.

La temperatura óptima de crecimiento es de 30-40°C.

Son anaerobios facultativos o microaerofílicos y su característica más importante es su capacidad de fermentar los azúcares a ácido láctico, y en base a esto se pueden separar en 2 grupos: Homofermentativos que forman en su mayor parte ácido láctico con cantidades mínimas de  $\text{CO}_2$  y ácido acético, y heterofermentativos que producen cerca del 50% de ácido láctico y el azúcar restante es descompuesta en ácido acético, ácido fórmico, etanol,  $\text{CO}_2$  y otros productos.

No reducen nitratos, no producen catalasa, gelatinasa, oxidasa, indol y  $\text{H}_2\text{S}$ .

Las colonias superficiales se han descrito como lisas, rugosas, en "huevo frito" y vidrio deslustrado. Algunas son planas, grisáceas y translúcidas. Varían considerablemente en tamaño. La apariencia colonial, sin embargo, depende de la naturaleza del medio, de las condiciones gaseosas del cultivo, las especies estudiadas y otros fac-

tores.

Los lactobacilos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se les encuentra en forma típica en productos lácteos, cereales y productos carneos, agua, aguas fecales (negras), cerveza, vinos, jugos de frutas, vegetales en conserva, levaduras y mosto, así como formando parte de la flora normal de la vagina, vías digestivas y la cavidad bucal de mamíferos y del hombre. Junto con algunos estreptococos y otros bacilos grampositivos, juegan un papel importante en la producción de la caries dental, ya que estas bacterias fermentan los azúcares dietéticos a ácido láctico, el cual disuelve los componentes minerales (fosfato e hidróxido de calcio) del esmalte y dentina.

Los lactobacilos constituyen los miembros predominantes de la flora comensal de la vagina durante diferentes periodos de vida, notables entre la pubertad y la menopausia. En estos periodos las células de la vagina acumulan glucógeno, polisacárido que es fermentado dando como producto final ácido láctico, responsable de la acidez de la mucosa vaginal ( PH 4.5 ).

Esta elevada acidez es una protección contra la adquisición de infecciones de o a través de la vagina, ya que -



la susceptibilidad de mujeres pre-pubertales a una vulvovaginitis gonococcica y a una peritonitis pneumococcica, y - la comun ocurrencia de vaginitis post-menopausica puede - ser debida a la no acidez de la secreción vaginal en estos periodos.

Varios autores utilizaban el término "bacilo de Döderlein" para designar una variedad de cepas vaginales humanas de lactobacilos, ahora se sabe que comprenden las especies: acidophilus, leichmanii, jensenii, fermentum y plantarum.

#### CLASIFICACION Y DESCRIPCION DE LAS ESPECIES DEL GENERO LACTOBACILLUS

- 1.- HOMO FERMENTATIVOS: Acido láctico como el mayor producto a partir de glucosa (generalmente 85% o más).
  - A.- No producen gas a partir de glucosa o gluconato; no fermentan la ribosa, no requieren tiamina; generalmente crecen a 45°C o más pero no a 20°C ni a 15°C. Las colonias son rugosas o también lisas y compactas en presencia de Tween 80.

Lactobacillus delbrueckii.- Bacilos de 0.5-0.8 - por cerca de 2-9 micras, con extremos redondeados, aislados y en cadenas cortas. Colonias usualmente rugosas y no pigmentadas. Temperatura óptima de crecimiento 40-44°C.

Aislado del licor fermentado (Leichman 1896), destilado de puré de papa agria, granos y puré de vegetales fermentados a más de 41°C.

L. leichmannii.- Bacilos de 0.6 por 2-4 micras, - aislados o en cadenas cortas. Colonias rugosas y no pigmentadas. Temperatura óptima de crecimiento 35-40°C.

Aislado de levaduras y leche fermentada (Henneberg 1903), y mosto.

L. jensenii.- Parecido a L. leichmannii. Descripción por Gesser, Mandel y Rogosa (1970). Aislado del flujo vaginal humano y coágulos de sangre.

L. lactis.- Bacilos menores de 2 micras de ancho, a menudo en formas largas con tendencia a crecer como filamentos fuertemente enortijados, aislados

dos en formas largas con tendencia a crecer como filamentos fuertemente ensortijados, aislados o en pares en medios jóvenes y vigorosos. Colonias rugosas de 1-3 mm de diámetro, no pigmentadas - - siendo de blancas a grfs claro. Temperatura ópti ma de crecimiento 40-43°C, pero puede crecer has\_ ta 50-52°C.

Aislado por Kern (1881) del Kefir. Se encuentra principalmente en la leche y productos lácteos.

L. bulgaricus.- Indistinguible de L. lactis. La única diferencia es que uno fermenta más azúcares que otro.

Aislado por Grigoroff en 1905 de Kissélo-Mléko, - leche fermentada de Bulgaria; descrito original\_ mente como "bacilo A". Encontrado en leche, par\_ ticularmente si son fermentadas.

L. helveticus.- Bacilos de 0.6-1 por 2-6 micrs. - aislados o en cadenas. En placas de agar, se ob\_ servan abundantes colonias de 2-3 mm de diámetro- o menos, normalmente opacas, blancas a grfs claro, rugosas o rizoides, en medios con Tween 80 las co

lonias tienden a ser largas y planas. Temperatura óptima de crecimiento 40-42°C, pero puede soportar temperaturas de 50-53°C.

Aislado por Orla-Jensen (1919) a partir de leche agria y quesos, particularmente Emmenthal y Gruyère.

L. acidophilus.- Probablemente idéntico con el "bacilo de Döderlein", el cual algunas veces se llamó *B. vaginalis* o *B. crassus*, y con *Thermobacterium* intestinalis.

Bacilos con extremos redondeados, 0.6-0.9 por 1.5-6 micras, aislados, en pares y cadenas cortas. Colonias normalmente rugosas, de forma irregular-debida a proyecciones ramificadas o radiadas, no-pigmentadas. Temperatura óptima de crecimiento 35-38°C, generalmente crece a 45°C y puede hacer lo a 48°C.

Aislado por Moro en 1900 de las heces de lactantes. Encontrado en la leche, heces de infantes alimentados con biberón, y a menudo de adultos, las heces de aproximadamente todos los mamíferos-

y de muchos peces e invertebrados, en la saliva, caries dental y vagina de humanos adultos y jóvenes.

L. salivarius.- Bacilos con extremos redondeados de 0.6-0.9 por 1.5-5 micras, aislados, en pares y en cadenas largas. Colonias rugosas de 1-3 mm de diámetro, no pigmentadas siendo de blancas a gris claro. Temperatura óptima de crecimiento 35-40°C.

Brevemente descrito por Rogosa y colegas (1953) - quienes lo aislaron de la saliva humana. Encontrado en la boca y tracto intestinal de hamster, en la boca del hombre y el tracto intestinal de gallinas.

B.- No producen gas a partir de glucosa pero sí de gluconato. La ribosa cuando es fermentada produce ácido láctico y acético sin gas. No requieren tiamina. Crecimiento variable a 45°C, creciendo a 15°C.

L. casei.- Bacilos cortos y largos, generalmente menos de 1.5 micras, a menudo con extremos rectos y tendencia a formar cadenas cortas y largas. En

cultivos puros las colonias son planas, con forma de lente, blancas o grfs-amarillo. Crece a 15°C- y también a 6°C.

Aislado de quesos por Freudenreich y Thöni (1903). Común en leche y productos lácteos, también en saliva.

Tres subespecies fueron reconocidas por Rogosa - (1953): casei, rhamnosus y alactosus.

Dos subespecies más fueron reconocidas por Abo-Elnaga y Kandler (1965): tolerans y pseudoplantarum.

L. xylosus.- Muy parecido a L. casei, y se diferencia de este en base a sus bioquímicas. Es el principal productor de ácido láctico a partir de glucosa.

Aislado por Kitahara (1938).

L. plantarum.- Bacilos con extremos redondeados - de 0.9-1.2 por 3-8 micras, aislados, en pares o - en cadenas cortas. Móvil, colonias de 3 mm de - diámetro, elevadas, redondas, lisas, compactas, -

blancas y ocasionalmente amarillo claro u obscuro. Temperatura óptima de crecimiento 30-35°C.

Descrito por Orla-Jensen (1919) bajo el nombre de Streptobacterium plantarum. Aislado de leche y productos lácteos, vegetales fermentados, ensilaje, verduras en conserva, levaduras, boca y tracto intestinal de humanos. Es probablemente el miembro del grupo Lactobacillus más extensamente distribuido.

L. curvatus.- Bacilos curvos de forma de haba de 0.7-0.9 por 1-1.2 micras, extremos redondeados, formando cadenas cortas o anillos cerrados constituidos por 4 células. Móvil. Temperatura óptima de crecimiento 30-37°C.

Descrito por Troili-Peterson (1903). Aislado de estiércol de vaca, medio ambiente de queserías, leche y ensilaje.

L. coryniformis subsp. coryniformis.- Cocobacilos, ocasionalmente en forma de pera de 0.8-1.1 por 1-3 micras, aislados, en pares o cadenas cortas.- Colonias y crecimiento indistinguibles de L. plan

tarum. Temperatura óptima de crecimiento 30-37°C.

Descrito por Abo-Elnaga y Klander (1965). Econ\_ trado principalmente en el ensilaje, estiércol de vaca y medio ambiente de queserías.

L. homohiochii.- Bacilos con terminaciones redon\_ deadas, de 0.7-0.8 por 2-4 micras u ocasionalmen\_ te 6 micras. Temperatura óptima de crecimiento - cerca de 30°C.

Descrito por Kitahara, Kanejo y Goto (1957). Als\_ lado del saké podrido.

II.- HETEROFERMENTATIVOS: A partir de la glucosa producen cerca del 50% de productos finales tales como ácido - láctico con considerables cantidades de CO<sub>2</sub>, ácido - acético y etanol; manitol a partir de fructosa.

A.- Producen gas a partir de glucosa y gluconato; fer\_ mentan la ribosa a ácido láctico y acético sin - producir gas. Requieren tiamina.

L. fermentum.- Bacilos variables en tamaño, usual\_ mente cortos de 0.5-1 por 3 ó más micras, algunas



veces en pares o en cadenas. Colonias generalmente planas, circulares o irregulares a rugosas, a menudo transparentes, no pigmentadas, pero algunas cepas producen un pigmento naranja rojizo. No crece a 15°C pero sí a 45°C; temperatura óptima de crecimiento 41-42°C.

Descrito por Beijerinck (1901). Aislado de levaduras, productos lácteos, vinos, estiércol, ensilaje, boca y heces de humanos y ratas. Extensamente distribuido en la fermentación de productos animales y vegetales.

L. cellobiosus.- Bacilos variables en tamaño, pueden ser cortos, a menudo de 0.5-1 por 3-5 micras o más en su longitud. Colonias variables desde planas, elevadas, butíricas, blanco grisáceas a rugosas o coliformes; mezclas de estas formas son comunes en cultivos puros. Crece en forma variable a 15°C pero no a 45°C; temperatura óptima de crecimiento 30-35°C.

Aislado por Rogosa y colegas (1953) de la saliva humana.

L. brevis.- Bacilos generalmente cortos y rectos,

de 0.7-1 por 2-4 micras, extremos redondeados, - aislados o en cadenas cortas. Colonias general-  
mente rugosas, planas, pueden ser casi transparen-  
tes, generalmente no pigmentadas. Crece a 15°C -  
pero no a 45°C; temperatura óptima de crecimiento  
cerca de 30°C.

Descrito por Orla-Jensen (1919). Aislado de le-  
che, kefir, queso, col fermentada (Saurkraut), to-  
mate fermentado, levaduras, ciertos suelos, ensi-  
laje, estiércol de vaca, heces, boca y tracto in-  
testinal de humanos y ratas.

L. buchneri.- Bacilos de 0.5-0.7 por 1-4 micras,  
aislados, en cadenas o en largos filamentos. Cre-  
ce a 15°C pero no a 45°C; temperatura óptima de -  
crecimiento 30°C.

Descrito por Henneberg (1903). Aislado en la fer-  
mentación de vegetales, además en intestino y bo-  
ca de humanos.

L. viridescens.- Bacilos pequeños, pueden ser co-  
cobacilos, de 0.8 por 2-4 micras, extremos redon-  
deados pero pueden estar adelgazados, aislados o-

en pares. Colonias generalmente lisas y compactas de 0.5-1 mm de diámetro, no pigmentadas. Crece a 5 y 15°C pero no a 45°C; temperatura óptima de crecimiento cerca de 40°C.

Descrito por Evans y Niven (1951), los cuales lo aislaron de productos curados de carne en los cuales produce una decoloración verde. Aislado de la mortadela y salchichas.

L. coprophilus.- Bacilos cortos con tendencia a engrosar por un extremo, de 0.8-1 por 2-4 micras, -- aislados o en cadenas cortas. Colonias de 2 mm de diámetro, blancas, con bordes y superficies lisas. Crece a 15°C pero no a 45°C; temperatura óptima de crecimiento cercana a 35°C.

Descrito por Klander y Abo-Elnaga (1966). Aislado de estiércol de vaca.

- 111.- HETEROFERMENTATIVOS: Producen ácido láctico, CO<sub>2</sub> y acetato. Se conocen pocos organismos. Crecimiento lento o la mayor parte de los carbohidratos le son "indiferentes". Fermentan gluconato, ribosa, malato, fructosa y xilosa; fermentación variable o poca de glucosa,

galactosa, sacarosa y maltosa; PH óptimo 4.5-5.5; temperatura óptima de crecimiento 30-35°C.

L. hilgardii.- Bacilos con extremos redondeados, de 0.5-0.8 por 2-4 micras, aislados, en cadenas cortas o frecuentemente formando largos filamentos. Los filamentos individuales pueden ser de 15 o más micras de largo. Grampositivos transformándose en gramnegativos y granuloso con el tiempo. Crecimiento moderado, elevado, hialino a color blanco y crema, con bordes enteros. No desarrolla a 45°C, crece en forma mínima o no a 15°C; temperatura óptima de crecimiento 28-35°C.

Descrito por Douglas y Cruess (1936). Aislado de los vinos de mesa de California.

Fermentan glucosa y fructosa; no fermentan generalmente malato y otros carbohidratos; temperatura óptima de crecimiento 25-30°C.

L. trichodes.- Bacilos de 0.4-0.6 por 2-4 micras, aislados, en pares y en cadenas. Muy largos, en cadenas filiformes y filamentosas frecuentemente forman acumulos. Las colonias se desarrollan len-

tamente y son pequeñas, subsuperficiales, blanco-cremosas y rugosas o irregulares. Temperatura óptima de crecimiento 25-30°C.

Descrito por Fornachon, Douglas y Vaughn (1949).- Aislado de vinos de sobremesa y aperitivos de California, Australia, Francia, España, conteniendo 20% de etanol o menos. En California este organismo ha sido comunmente nombrado como "bacilo de filamento o cabello", "bacilo algodónoso", "moho algodónoso" o "moho de Fresno".

Fermentan fructosa y gluconato, débil actividad al malato y débil o negativa fermentación de la glucosa, no fermentan ribosa ni otros carbohidratos; temperatura óptima de crecimiento 25-30°C.

L. fructivorans.- Bacilos de 0.5-0.8 por 1.5-4 micras, aislados, en pares y a menudo en cadenas - con largos filamentos curvos enrollados. Temperatura óptima de crecimiento 25-30°C; puede o no crecer a 15°C y a 40°C.

Descrito por Charlton, Nelson y Werkman (1934). - Aislado de aderezos y mayonesas echadas a perder.

Fermentan arabinosa; glucosa, fructosa y galactosa pueden ser fermentados; no fermentan malato y otros carbohidratos. Temperatura óptima de crecimiento menor de 30°C y buen crecimiento a 10°C.

L. desidiosus.- Bacilos de 0.7-1 por 2-4 micras, aislados con tendencia a formar frecuentemente filamentos.

Descrito por Vaughn, Douglas y Fornachon (1949).- Aislado de granos de Kefir.

**CAPITULO III**

**MATERIAL Y METODOS**

El material y los reactivos empleados fueron los siguientes, no anotándose las cantidades en el caso de los reactivos ni el número de piezas en el caso de los materiales, puesto que para la preparación de cada medio y reactivo se utilizó la cantidad y material necesario para prepararlos según instrucciones de la casa comercial.

**Medios de cultivo:**

Agar jugo de tomate  
Caldo microinoculación  
Bacto agar

**Para pruebas bioquímicas:**

Agar hierro de Kliger  
Caldo fructosa  
Caldo indol nitrito  
Caldo maltosa  
Caldo manitol  
Caldo sorbitol  
Caldo xilosa

**Reactivos:**

Alfa-naftilamina al 0.5%



Acido sulfanilico al 0.8%  
Tetrametilfenilendiamina al 1%  
Peróxido de hidrógeno  
Tiras reactivas para el PH  
Agua destilada

**Unidiscos SENSIBAC:**

Ampicilina 10 microgramos  
Acido nalidixico 30 microgramos  
Carbencicilina 100 microgramos  
Cloranfenicol 30 microgramos  
Colimicina 30 microgramos  
Eritromicina 15 microgramos  
Lincomicina 2 microgramos  
Neomicina 30 microgramos  
Penicilina 10 U  
Sulfametoxazol-Trimetoprim 25 microgramos  
Trisulfa 150 microgramos

**Material:**

Algodón  
Asas de platino  
Autoclave  
Balanza analítica

Cajas de Petri  
Espátulas  
Estufas para incubación  
Goteros  
Gradillas de madera  
Jarras para anaerobiosis  
Matraz erlenmeyer de 250 y 500 ml  
Mecheros  
Microscopio  
Papel filtro  
Palillos de madera  
Pinzas  
Pipetas graduadas de 1 y 5 ml  
Pipetas Pasteur  
Porta y cubreobjetos  
Termómetro  
Tubos de ensayo

#### MEDIOS DIFERENCIALES Y SELECTIVOS:

Son muy útiles cuando la muestra proviene de alguna parte del cuerpo, en donde existe flora normal, por lo cual el desarrollo de los habitantes normales puede ser ampliamente inconveniente y se requerirá entonces de medios que supriman este crecimiento y al mismo tiempo que favo-

rezcan el crecimiento de invasores los cuales en patología clínica, son denominados como los organismos deseados. Con este propósito han sido creados los medios de este tipo y como las propiedades inhibitorias pueden ser específicas, el medio de cultivo escogido, debe ser de acuerdo al microorganismo que tratemos de aislar.

Los medios utilizados en el presente trabajo son medios ácidos ya que los lactobacilos crecen mejor a un PH cercano a 6.0.

#### A.- AGAR JUGO DE TOMATE.

Se utiliza para el cultivo y enumeración de lactobacilos, los cuales crecen escasamente en medios de cultivo ordinarios y requieren nutrientes especiales. Mickle y Breed informaron el uso de jugo de tomate en medios de cultivo para lactobacilos. Kulp, mientras investigaba el uso de jugo de tomate en el desarrollo bacteriano, encontró que el crecimiento de L. acidophilus se potenciaba en medios que contenían este material. Más tarde Kulp y White describieron una modificación del medio original que proporcionaba recuentos cuantitativos relativamente altos.

Se prepara de acuerdo a la modificación de Kulp y White

te y contiene Bacto Peptone (peptona) y Bacto Peptoni\_ zed Milk (leche peptonizada). El medio rehidratado es muy adecuado para el cultivo de miembros del grupo Lac\_ tobacillus.

PH final  $6.1 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### B.- CALDO MICROINOCULACION.

Se emplea satisfactoriamente para preparar los inóculos de lactobacilos, utilizados en los análisis por métodos microbiológicos de vitaminas y aminoácidos.

Las cepas adecuadas y escrupulosamente controladas de - lactobacilos, se mantienen en refrigeración por tubos - de agar microinoculación (caldo microinoculación más - 10.0 gr de agar por litro) inoculados por picadura; a - partir de los cuales se preparan los inóculos en el me\_ dio líquido siguiendo estrictamente la técnica del aná\_ lisis de que se trate, ya que el tamaño del inóculo y - la edad del cultivo son factores sumamente importantes - de tomarse en cuenta, si se quiere obtener resultados - comparables y satisfactorios.

PH final  $5.7 \pm 0.2$

PRUEBAS BIOQUIMICAS:

## A.- AGAR HIERRO DE KLIGER (KIA).

Es un medio diferencial en tubo que se utiliza para de-  
terminar la capacidad de un organismo de atacar un car-  
bohidrato específico (glucosa y lactosa) incorporado -  
en un medio de crecimiento básico, con o sin produc-  
ción de gas, junto con la determinación de posible pro-  
ducción de ácido sulfhídrico. La fermentación se pro-  
duce aeróbicamente (en la parte inclinada) y anaeróbi-  
camente (en la parte inferior). En la inclinación el-  
monosacárido glucosa es catabolizado inicialmente por-  
medio del ciclo anaeróbico de Embden-Meyerhof-Parnas,-  
utilizado tanto por aerobios como por los anaerobios,-  
produciendo como intermediario el ácido pirúvico. A -  
su vez, este ácido es degradado por medio del ciclo de  
Krebs, por los microorganismos aerobios o anaerobios -  
facultativos.

Lactosa ~~beta-galactosidasa~~ glucosa + galactosa

Glucosa o galactosa ~~ciclo de Krebs~~  $\rightarrow$   $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{energía}$   
aeróbico

En la capa profunda del medio, existen condiciones - -  
anaeróbicas por lo cual es metabolizada la glucosa a -

través del ciclo de Embden-Meyerhof-Parnas en ATP y ácido pirúvico, el cual después es convertido en diversos productos finales estables: ácido láctico y/u - - otros ácidos orgánicos, aldehídos, alcoholes,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  y energía.

	ácidos orgánicos
	aldehídos
Glucosa	alcoholes
<u>ciclo de Embden-</u>	$\text{CO}_2 + \text{H}_2$
Meyerhof-Parnas	energía

Se ha observado tres formas básicas de fermentación en el medio de KIA:

- 1.- Fermentación sola de la glucosa.
- 2.- Fermentación tanto de la glucosa como de la lactosa.
- 3.- No fermentación de glucosa ni de lactosa.

El indicador de PH en esta prueba es el rojo de fenol, los indicadores del  $\text{H}_2\text{S}$  son: tiosulfato de sodio, citrato férrico de amonio.

Los resultados se interpretan como sigue:

A.- Utilización del carbohidrato.

- 1.- Fermentación sola de la glucosa.

(a) en la parte inclinada: reacción alcalina (color rojo).

(b) En el fondo: reacción ácida (color amarillo) -

2.- Fermentación tanto de la glucosa como de la lactosa.

(a) en la parte inclinada: reacción ácida (color amarillo).

(b) En el fondo: reacción ácida (color amarillo).-

3.- No fermentación de la glucosa ni de la lactosa.

(a) En la parte inclinada: reacción alcalina (color rojo).

(b) En el fondo: reacción alcalina (color rojo).

B.- Producción de gas.

1.- Una o varias burbujas en el medio.

2.- Hidrólisis del medio.

3.- Desplazamiento completo del medio del fondo -- del tubo dejando un área clara.

4.- Ligera muesca del medio en el costado del tubo.

C.- Producción de ácido sulfhídrico: presencia de un -

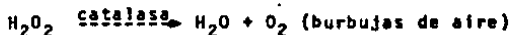
precipitado negro.

- 1.- Distribuido por toda la capa profunda, enmascaran\_ do la acidez.
- 2.- Distribuido en la capa profunda, pero no oculta to\_ talmente la acidez.

#### B.- REACCION DE LA CATALASA.

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido - de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua. La mayoría de - las bacterias aerobias y anaerobias facultativas po\_ - seen actividad de catalasa. La mayor parte de bacte\_ - rias anaerobias descompone el peróxido de hidrógeno - con peróxidasas semejantes a la catalasa.

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los pro\_ - ductos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los carbohidratos. La catalasa transforma el  $H_2O_2$  en - agua y oxígeno, como lo demuestra la siguiente reacción:



Esta prueba se realiza de una manera sencilla transfi\_ - riendo células del centro de una colonia bien aislada - a la superficie de un portaobjetos, se añaden 1 ó 2 go\_ - tas de peróxido de hidrógeno al 3%.



La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva. Dado que las bacterias pueden poseer enzimas distintas - de la catalasa, capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno, unas pocas burbujas diminutas formadas a los 20 ó 30 segundos no se consideran una prueba positiva.

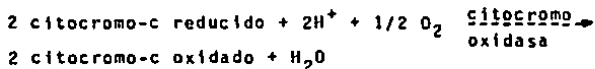
#### C.- REACCION DE LA OXIDASA.

La prueba de la oxidasa está basada en la producción bacteriana de una enzima oxidasa. Esta reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones.

El sistema citocromo se encuentra en los organismos aerobios o anaerobios facultativos, de modo que esta prueba es importante para identificar a aquellos organismos que carecen de la enzima o son anaerobios obligados.

Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y actúan como el último eslabón de la cadena respirato

ria aerobia, transfiriendo electrones (hidrógeno) al oxígeno, con formación de  $H_2O$ .



La prueba utiliza diversos colorantes, tales como la tetrametilfenilendiamina al 1% y el diclorhidrato de p-fenilendiamina, que actúan como aceptores artificiales de electrones, sustituyendo al oxígeno. Los colorantes son incoloros en estado reducido, pero en presencia de citocromo oxidasa y oxígeno atmosférico se oxidan formando azul de indofenol.



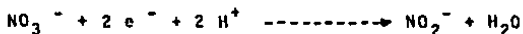
La prueba se lleva a cabo añadiendo 2 ó 3 gotas de reactivo a una tira de papel filtro, en la zona del papel donde se halla el reactivo se extiende una asa de la colonia sospechosa. Las colonias bacterianas con actividad de citocromo oxidasa desarrollan en segundos un intenso color azul en el sitio de inoculación.

#### D.- REDUCCION DE NITRATOS.

La capacidad de un organismo para reducir nitratos a -

nitritos es una característica importante utilizada para la identificación y diferenciación de especies de muchos grupos de microorganismos.

Los organismos que reducen nitratos tienen la capacidad de obtener oxígeno de los nitratos para formar nitritos y otros productos de reducción. La ecuación química es:



Se inocula el medio de nitrato (caldo indol nitrito) con un asa del inóculo puro del organismo aislado y se incuba a 35°C por 18 a 24 horas. Finalmente, se añade al medio 1 ml de alfa-naftilamina al 0.5% y 1 ml de ácido sulfanílico al 0.8%. El desarrollo de un color rojo a los 30 segundos de añadir los reactivos indica la presencia de nitritos y representa una reacción positiva para la reducción de nitratos. La ausencia de color indica que los nitratos no han sido reducidos.

#### E.- PRUEBA DE FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS.

Es común que los microbiólogos laboratoristas designen como azúcares a todos los carbohidratos. Esto es conveniente en el sentido operacional, habida cuenta que-

Los poli-alcoholes no son realmente azúcares en el sentido químico. La prueba se utiliza para determinar la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un carbohidrato específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido, o ácido con gas visible. Las formas de fermentación son generalmente características para grupos o especies bacterianas específicas. La fermentación es un proceso metabólico de oxidación-reducción anaeróbica en el cual un sustrato orgánico sirve como el aceptor final de hidrógeno. La fermentación de sustratos orgánicos tales como los carbohidratos dan tantos productos finales reducidos como oxidados. El tipo de productos finales dependerá de varios factores:

- 1.- El tipo de organismo que lleva a cabo este proceso de fermentación.
- 2.- La naturaleza del sustrato que debe ser fermentado.
- 3.- Los factores ambientales tales como temperatura y acidez.

El más importante ciclo fermentativo de la degradación de la glucosa es el ciclo de Embden-Meyerhof-Parnas, aunque la degradación puede ocurrir por o en combinación con la vía de las pentosas o el ciclo de Entner--

Duodoroff. Sin embargo, cualquiera de los tres ciclos requiere la fosforilación de la glucosa como el paso inicial para la degradación (esquema No. 1).

El ácido pirúvico es el intermediario clave en la degradación de la glucosa.

Los productos finales característicos de la fermentación bacteriana son: (1) ácido láctico, (2) ácido acético y fúngico, (3) ácido láctico y alcohol etílico, (4) alcohol etílico, (5) acetilmetilcarbinol y  $\text{CO}_2$ , (6) ácido succínico a ácido propiónico y  $\text{CO}_2$ , (7)  $\text{CO}_2$  y acetona a isopropanol, - (8) ácido butírico a butanol (alcohol butílico).

Existen distintas clases de fermentación producidas por las bacterias y cada una depende de los productos finales característicos formados.

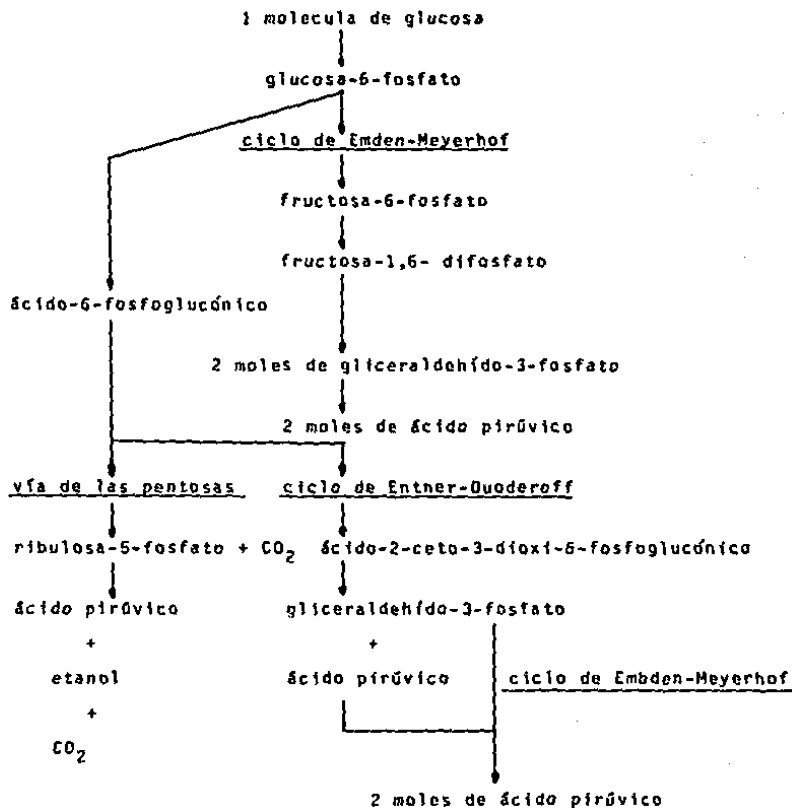
Las principales formas de fermentación de los grupos más importantes de bacterias son:

- a) Fermentación alcohólica.
- b) Fermentación del ácido láctico.
- c) Fermentación del ácido propiónico.
- d) Fermentación del grupo coliforme.

**e) Fermentación del alcohol butílico.**

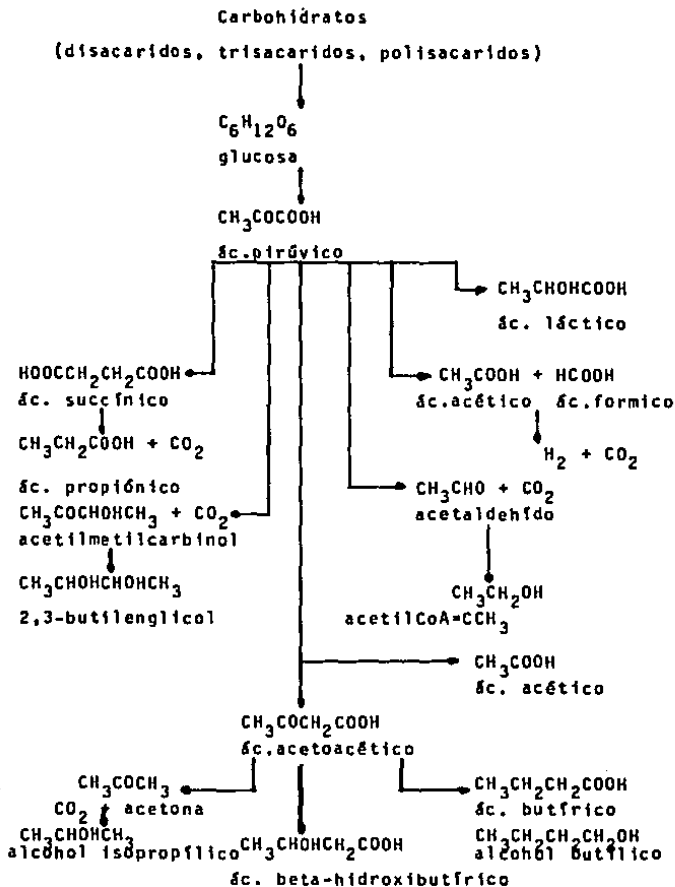
El indicador de PH comunmente utilizado para demostrar que los carbohidratos han sido fermentados es el rojo de fenol. Los resultados se interpretan como sigue:

- 1.- Positivo: reacción ácida (color amarillo).
- 2.- Retardado: reacción lenta (color anaranjado), si no se tiene seguridad comparar con el tubo no inoculado.
- 3.- Negativo: reacción alcalina (color rojo).

ESQUEMA No. 1TRES CICLOS DE FERMENTACION FOSFORILADA

ESQUEMA No. 2

Donde se muestra la fermentación de los diferentes azúcares.

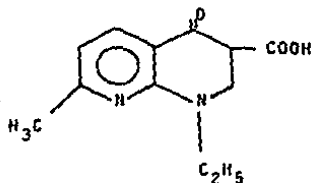




ANTIBIOTICOS:

## A.- ACIDO NALIDIXICO.

Es un compuesto químico sintético cuya fórmula estructural es:



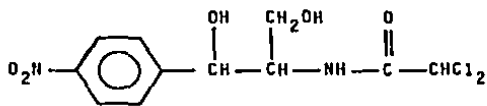
Mecanismo de acción.- Inhibe la síntesis de DNA.

Actividad antimicrobiana.- Es bactericida para la mayoría de las bacterias gramnegativas. Es menos activo contra los microorganismos grampositivos. Se produce resistencia adquirida a la droga durante el tratamiento, pero la misma no parece ser transferible.

## B.- CLORANFENICOL.

Se aisló por primera vez de los cultivos de Streptomyces venezuelae. Es el único de los antibióticos de importancia clínica que se fabrica sintéticamente. Se fabrica a gran escala a partir de la p-nitroacetofenona. El cloranfenicol es inactivado por las enzimas que reducen el grupo nitro, lo convierten en un grupo amino aromático pri

mario e hidrolizan el enlace amídico; también es acetilado. Su fórmula estructural es:



**Mecanismo de acción.**- Inhibe la síntesis proteica ya que actúa insertándose en la subunidad 50S del ribosoma. Interfiere con el enlace de nuevos aminoácidos en la cadena peptídica naciente, primordialmente debido a que el cloranfenicol inhibe la peptidiltransferasa.

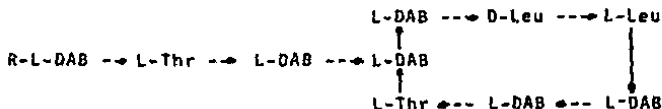
**Actividad antimicrobiana.**- Tiene un espectro de actividad bastante amplio. Principalmente es bacteriostático, y el desarrollo de los microorganismos se reanuda (es decir, la acción medicamentosa es reversible) cuando se suspende el medicamento, pero en condiciones especiales es bactericida en ciertas especies. La mayor parte de las bacterias gram positivas son inhibidas y muchas bacterias gramnegativas.

#### C.- COLIMICINA (COLISTINA, POLIMIXINA E).

Pertenece al grupo de las polimixinas, las cuales cons

tituyen un grupo de péptidos antibióticos básicos derivados de un bacilo del suelo portador de esporas y que tienen una acción selectiva contra las bacterias gramnegativas. Elaborado por diversas cepas de B. polymyxa y B. colistinus.

Es la polimixina E, y es idéntica a la polimixina B, excepto por la sustitución de un residuo de D-leucina en lugar de la D-fenilalanina. Su fórmula estructural es:



R= (+)-6-metiloctanóilo

DAB= alfa, gama- ácido diaminobutírico

Leu= leucina

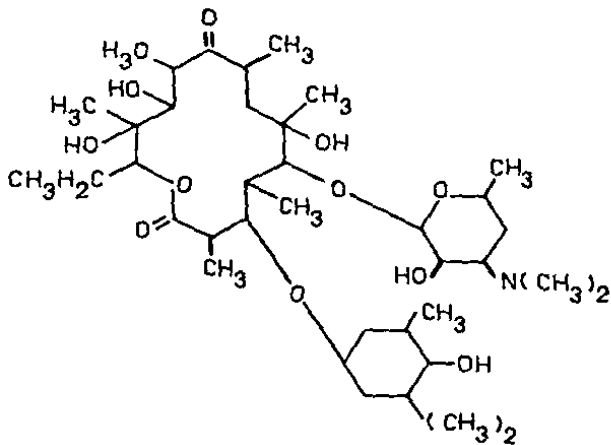
Thr= tirosina

Mecanismo de acción.- Es un agente de actividad superficial. Su molécula contiene grupos lipófilos separados y grupos lipofílicos. Se cree que la capacidad de estos grupos para orientarse en las películas de lípidos y proteínas produce una desorientación en la membrana lipoproteínica de las bacterias, de modo que ya no funciona como barrera osmótica eficaz y deja escapar el contenido celular.

Actividad antimicrobiana.- Su actividad in vivo e in vitro está claramente limitada a las bacterias gramnegativas.

#### D.- ERITROMICINA.

Es un antibiótico de eficacia oral, obtenido de los productos metabólicos de Streptomyces erythreus. Es uno de los antibióticos macrólidos, así llamados por que contienen un anillo de lactona de muchos miembros al que se unen uno o más desoxiazúcares. Su fórmula estructural es:

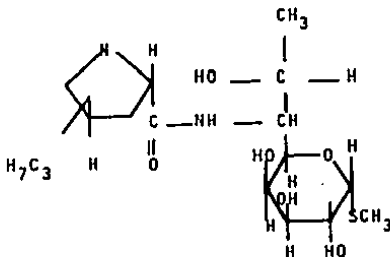


**Mecanismo de acción.-** Inhibe la síntesis proteínica por so  
bre la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos.

**Actividad antimicrobiana.-** Su acción es tanto inhibitoria-  
como bactericida para los organismos sensibles. Es efecti  
va contra microorganismos grampositivos, no es activa con-  
tra la mayoría de los bacilos aerobios gramnegativos.

#### E.- LINCOMICINA.

Es un antibiótico elaborado por Streptomyces lincolnen  
sis. Se parece a la eritromicina en cuanto a la actividad.  
Su fórmula estructural es:



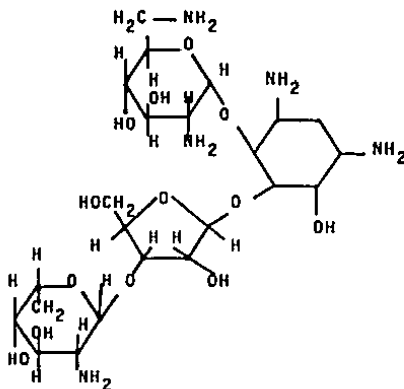
**Mecanismo de acción.-** Se une exclusivamente a la subunidad  
50S de los ribosomas bacterianos y suprimen la síntesis de  
proteínas.

**Actividad antimicrobiana.-** Un rasgo particular es su acti

vidad contra las bacterias anaeróbicas notablemente los co  
cos y bacilos gramnegativos.

#### F.- NEOMICINA.

Es un antibiótico de amplio espectro, aislado de Strep  
tomyces fradiae. Su fórmula estructural es:



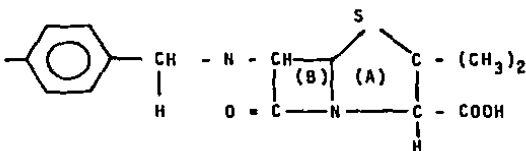
Mecanismo de acción.- Inhibe la síntesis de proteínas.

Actividad antimicrobiana.- Antibiótico de amplio espectro. Los medicamentos del tipo de la neomicina son bactericidas para muchas bacterias grampositivas, gramnegativas y mico\_ bacterias. La neomicina puede sustituir a la estreptomici\_ na contra las bacterias que se han vuelto resistentes a es

ta.

### G.- PENICILINA.

En los primeros años de su producción, procedía de sub cultivos de la cepa de Penicillium notatum, actualmente se utiliza un mutante de una cepa de P. chrysogenum. La estructura básica de las penicilinas consiste en un anillo de tiazolidina (A) unido a un anillo beta-lactámico (B) al que está unida una cadena lateral. Su estructura química es:



Mecanismo de acción.- Inhiben la síntesis de la pared celular.

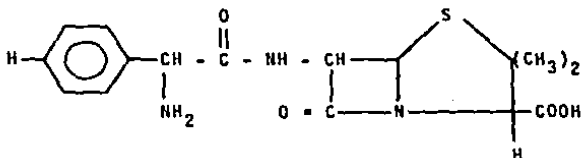
Actividad antimicrobiana.- Es muy activa contra microorganismos grampositivos y gramnegativos.

Entre las principales penicilinas tenemos:

#### a.- AMPICILINA.

Esta droga es un compuesto semisintético derivado del-

ácido 6-aminopenicilánico, pero difiere de las otras penicilinas por su mayor espectro de eficacia antimicrobiana. La ampicilina es desintegrada por la penicilinasas, por lo tanto, carece de valor en el tratamiento de infecciones por estafilococos u otros microorganismos que elaboran esta enzima. Su fórmula estructural es:



Mecanismo de acción.- Inhibe la síntesis de la pared celular.

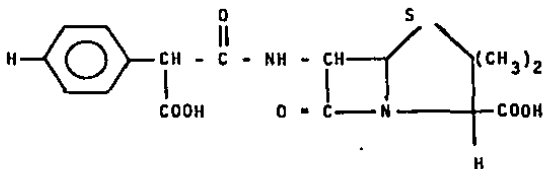
Actividad antimicrobiana.- Reprime la proliferación de bacterias grampositivas y gramnegativas. Algo menos activa que la penicilina G contra cocos grampositivos sensibles a este agente.

#### b.- CARBENICILINA.

Esta droga es un derivado del ácido-6-aminopenicilánico sensible a la penicilinasas. Los principales inconvenientes son el rápido desarrollo de resistencia bacteriana en el tratamiento si no se emplean grandes dosis, la necesidad



de la vfa parenteral y el precio elevado. Su fórmula es estructural es:

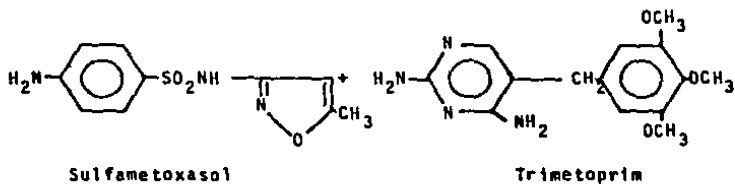


Mecanismo de acción.- Inhibe la síntesis de la pared celular.

Actividad antimicrobiana.- Las concentraciones bajas de carbenicilina inhiben el crecimiento de Proteus mirabilis y muchos microorganismos sensibles a la penicilina G. Los microorganismos se vuelven rápidamente resistentes a la carbenicilina in vitro. También aparece resistencia bacteriana in vivo durante el tratamiento con dosis subóptimas.

#### H.- SULFAMETOXASOL-TRIMETOPRIM.

El sulfametoxazol es una sulfonamida insoluble en agua, pero su sal sódica es fácilmente soluble. El trimetoprim es un polvo cristalino de color amarillo pálido. Ambos combinados dan una amplia actividad antimicrobiana, su fórmula estructural es:



Mecanismo de acción.- La actividad antimicrobiana de la com  
binación de trimetoprim y sulfametoxazol, resulta de sus -  
 unteracciones sobre dos etapas de la vía enzimática para la  
 sntesis de ácido tetrahidrofólico. La sulfamida inhibe la  
 incorporación de PABA (ácido p-amininobenzoico) en el ácido  
 fólico y el trimetoprim inhibe la reducción de dihidrofóla\_  
 to a tetrahidrofólato y en consecuencia altera la síntesis-  
 de DNA.

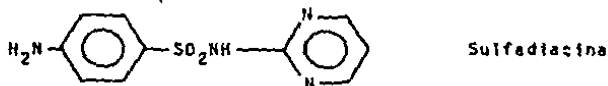
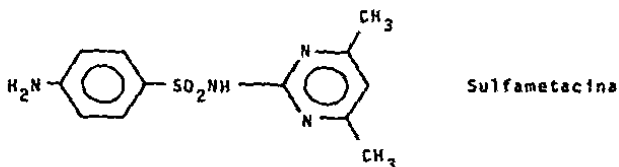
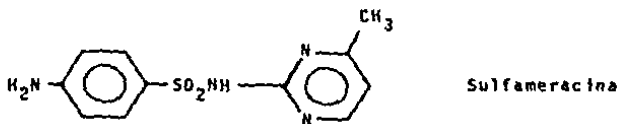
Actividad antimicrobiana.- Efecto bactericida potente con\_  
 tra gran variedad de microorganismos.

### 1.- TRISULFA.

Es una mezcla de medicamentos sulfonamídicos (sulfadia\_  
 cina, sulfameracina y sulfametacina), en la que cada compo\_  
 nente muestra su propia solubilidad, por lo tanto, una mez\_  
 cla puede ser mucho más soluble, en términos de la sulfona\_  
 mida total presente, que un solo medicamento total usado. -  
 Esta es la razón para el empleo de las trisulfapirimidinas,

preparación que permite una dosificación tres veces mayor que un solo medicamento en cuanto a solubilidad. Todas tienen el mismo núcleo al cual se han unido varios radicales R- en el grupo amida ( $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ) o en el cual se han hecho diversas sustituciones del grupo amino ( $\text{NH}_2$ ).

Sus fórmulas estructurales son:



Mecanismo de acción.- Son inhibidores competitivos de la enzima bacteriana responsable de la incorporación de PABA al ácido dihidropterídico, el precursor inmediato del ácido fólico (ácido pteroilglutámico, PGA) y por lo tanto del crecimiento y multiplicación celular.

Actividad antimicrobiana.- Antibiótico de amplio espectro, al cual son sensibles todos los microorganismos grampositivos y cocos gramnegativos.

#### METODO.

Se recolectaron 150 muestras de heces de niños recién nacidos a ocho años de edad proporcionadas por diferentes hospitales.

De estas heces 39 procedían de lactantes y el resto de pacientes con más de tres años.

Las muestras fueron tomadas con hisopos estériles y colocado aproximadamente 1 gr en el medio de transporte (caldo microinoculación). Una vez obtenidas se llevaron al laboratorio donde fueron procesadas de la siguiente manera: - inoculación de 1 ml de la muestra en 15 ml de caldo microinoculación, incubación a 37°C durante 48 horas; transcurrido ese tiempo, se procedió a inocular los medios selectivos agar jugo de tomate y caldo microinoculación más agar, sembrándose por la técnica de aislamiento por estrías, incubándose a 37°C durante 48 horas en atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>.

Pasado el tiempo de incubación, se veía el desarrollo en los medios, y a las colonias sospechosas se les practicó la tinción de Gram, examen de motilidad en fresco y pruebas bioquímicas: reacción de la oxidasa, reducción de nitratos y pruebas de fermentación de carbohidratos (fructosa, glucosa,

sa, lactosa, maltosa, manitol, sorbitol y xilosa.)

Hecho esto se procedió a su identificación y clasificación en base a los resultados obtenidos, siguiendo los criterios taxonómicos del Berge's Manual of Determinative-Bacteriology.

Posteriormente se suspendió cada colonia identificada en 3 ml de caldo microinoculación a 37°C durante 48 horas, para obtener suficiente masa microbiana.

Una vez realizado lo anterior, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlo se eliminó el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo.

Se inocularó con este hisopo la superficie de una placa de caldo microinoculación más agar. A fin de cubrir uniformemente toda la superficie de la placa, se sugiere es-triarla con el hisopo en por lo menos 3 direcciones, dando vuelta a la placa en un ángulo de 60° luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, se colocaron los unidiscos con antibiótico sobre la superficie del medio con ayuda de una pinza estéril, separándolo por lo menos a 22 mm uno -

del otro y a 14 mm del borde de la caja para evitar que --  
las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan has\_  
ta el borde de la caja. Las cajas se incubaron a 37°C du\_  
rante 24 horas en atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>.

PLAN DE TRABAJO

MUESTRA DE HECES

1 gr

CALDO MICROINOCULACION

48 hrs a 37°C

CALDO MICROINOCULACION MAS AGAR

AGAR JUGO DE TOMATE

48 hrs a 37°C

a 10% CO<sub>2</sub>

TINCION DE GRAM

MOTILIDAD EN FRESCO

PRUEBAS BIOQUIMICAS

CALDO MICROINOCULACION

24-48 hrs a 37°C

CALDO MICROINOCULACION MAS AGAR

+

UNIDISCOS SENSIBAC

24 hrs a 37°C  
a 10% de CO<sub>2</sub>

## CAPITULO IV

### RESULTADOS



Para la realización de este trabajo se recolectaron - 150 muestras fecales proporcionadas por diferentes hospitales. El único parámetro que se tomó en cuenta del paciente, fue la edad que osciló de cero meses a ocho años de edad.

Los resultados obtenidos en esta investigación están dados en las tablas que se anexan a este trabajo.

En la tabla No. 1 se hace referencia del grupo y especie de Lactobacillus en 96 heces positivas a estos microorganismos ya que de las 150, 54 carecían de los mismos.

TABLA No. 1

Lactobacillus AISLADOS EN 96 HECES

	<u>Cepas</u>	<u>% del total</u>
HOMOFERMENTATIVOS	98	71.01
L. delbrueckii	7	5.07
L. bulgaricus	5	3.62
L. helveticus	8	5.80
L. acidophilus	21	15.22
L. casei	5	3.62

	<u>Cepas</u>	<u>% del total</u>
L. casei subsp tolerans	2	1.45
L. casei subsp pseudopiantarum	27	19.56
L. xylosus	8	5.80
L. plantarum	5	3.62
L. coryniformis subsp coryniformis	8	5.80
L. coryniformis subsp torquens	2	1.45
HETEROFERMENTATIVOS	40	28.99
L. fermentum	1	0.73
L. cellobiosus	6	4.35
L. coprophilus	3	2.17
L. fructivorans	11	7.97
L. desidiuosus	19	13.77

TOTAL DE CEPAS: 138

Estos mismos resultados pero particularizando si las he-  
ces procedían de lactantes o de pacientes con más de tres  
años se recogen en las tablas No. 2 y 3.

TABLA No. 2

---

Lactobacillus AISLADOS EN 20 HECES DE LACTANTES
 

---

	<u>Cepas</u>	<u>% del total</u>
HOMOFERMENTATIVOS	17	62.96
<i>L. delbrueckii</i>	2	7.41
<i>L. bulgaricus</i>	1	3.70
<i>L. helveticus</i>	-	--
<i>L. acidophilus</i>	3	11.11
<i>L. casei</i>	2	7.41
<i>L. casei</i> subsp <i>tolerans</i>	1	3.70
<i>L. casei</i> subsp <i>pseudopiantarum</i>	1	3.70
<i>L. xylosus</i>	4	14.81
<i>L. plantarum</i>	3	11.11
<i>L. coryniformis</i> subsp <i>coryniformis</i>	-	--
<i>L. coryniformis</i> subsp <i>torquens</i>	-	--
HETEROFERMENTATIVOS	10	37.04
<i>L. fermentum</i>	-	--
<i>L. cellobiosus</i>	2	7.41
<i>L. coprophilus</i>	2	7.41
<i>L. fructivorans</i>	2	7.41
<i>L. desidiosus</i>	4	14.81

TOTAL DE CEPAS: 27

TABLA No. 3

-----  
Lactobacillus AISLADOS EN 76 HECEs DE NO LACTANTES  
 -----

	<u>Cepas</u>	<u>% del total</u>
HOMOFERMENTATIVOS	81	72.97
<i>L. delbrueckii</i>	5	4.50
<i>L. bulgaricus</i>	4	3.60
<i>L. helveticus</i>	8	7.21
<i>L. acidophilus</i>	18	16.22
<i>L. casei</i>	3	2.70
<i>L. casei</i> subsp <i>tolerans</i>	1	0.90
<i>L. casei</i> subsp <i>pseudopantarum</i>	26	23.42
<i>L. xylosum</i>	4	3.60
<i>L. plantarum</i>	2	1.80
<i>L. coryniformis</i> subsp <i>coryniformis</i>	8	7.21
<i>L. coryniformis</i> subsp <i>torquens</i>	2	1.80
HETEROFERMENTATIVOS	30	27.03
<i>L. fermentum</i>	1	0.90
<i>L. cellobiosus</i>	4	3.60
<i>L. coprophilus</i>	1	0.90
<i>L. fructivorans</i>	9	8.11
<i>L. desidiosus</i>	15	13.51

TOTAL DE CEPAS: 111

De acuerdo con los datos obtenidos se confeccionó la tabla No. 4 para indicar las especies frecuentes, poco frecuentes y raras en las muestras estudiadas.

-----  
 TABLA No. 4  
 -----

CLASIFICACION DE LAS ESPECIES AISLADAS ATENDIENDO A SU FRECUENCIA  
 -----

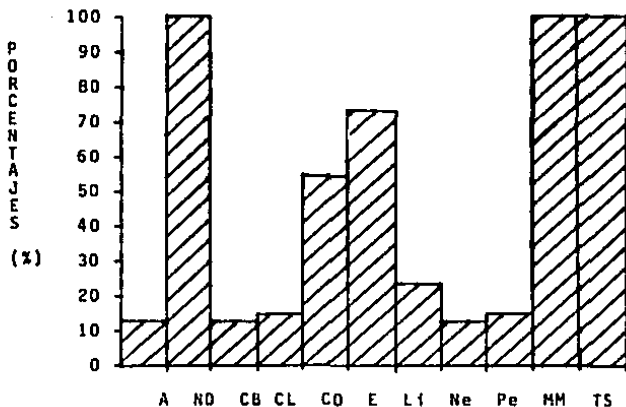
Especies	Grupos	Porcentajes
L. casei subsp pseudopantarum	Frecuentes	más del 10
L. acidophilus		
L. desidiosus		
-----		
L. fructivorans	Poco frecuentes	Del 5 al 10
L. herveticus		
L. xylois		
L. coryniformis subsp coryniformis		
L. delbrueckii		
-----		
L. cellobiosus	Muy poco frecuentes o raros	menos del 5
L. bulgaricus		
L. casei		
L. plantarum		
L. coprophilus		
L. casei subsp tolerans		
L. coryniformis subsp torquens		
L. fermentum		

Los resultados obtenidos al realizar los antibiogramas, se presentan en la tabla No. 5, reportándose la resistencia (R), sensibilidad (S) o sensibilidad media (SM) de las especies, así como sus correspondientes porcentajes a cada antimicrobiano.

TABLA No. 5

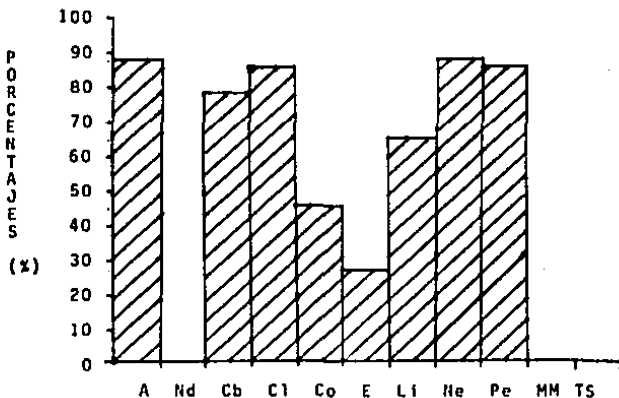
-----  
 RESULTADOS GLOBALES DE LOS ANTIBIOGRAMAS REALIZADOS EN 40 -  
 CEPAS DE Lactobacillus  
 -----

	<u>R</u>	<u>SM</u>	<u>S</u>
Ampicilina	5 (12.5)	0	35 (87.5)
Acido nalidixico	40 (100)	0	0
Carbenicilina	5 (12.5)	4 (10.0)	31 (77.5)
Cloranfenicol	6 (15.0)	0	34 (85.0)
Colimicina	22 (55.0)	0	18 (45.0)
Eritromicina	29 (72.5)	0	11 (27.5)
Lincomicina	9 (22.5)	5 (12.5)	26 (65.0)
Neomicina	5 (12.5)	0	35 (87.5)
Penicilina	6 (15.0)	0	34 (85.0)
Sulfametoxazol-Tri_			
metoprim	40 (100 )	0	0
Trisulfa	40 (100 )	0	0



**DIAGRAMA No. 1**

RESISTENCIA DEL GENERO Lactobacillus A LOS DIFERENTES ANTIBIOTICOS



**DIAGRAMA No. 2** SENSIBILIDAD DEL GENERO Lactobacillus A LOS DIFERENTES ANTIBIOTICOS.

En la tabla No. 6 puede observarse una clasificación de los agentes antimicrobianos según la resistencia del género Lactobacillus.

TABLA No. 6

-----  
 CLASIFICACION DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS SEGUN LA MAYOR  
 O MENOR RESISTENCIA DEL GENERO Lactobacillus  
 -----

Acido nalidixico

Sulfametoxazol-Trimetoprim

Resistencia del 100%

Trisulfa

-----  
 Resistencia 75-menos del  
 100%

Colimicina

Resistencia 50-75%

Eritromicina

-----  
 Resistencia 25-50%

Ampicilina

Carbenicilina

Cloranfenicol

Resistencia 0-25%

Lincomicina

Neomicina

Penicilina



Los resultados obtenidos se clasificaron en base al cuadro siguiente; para lo que las especies fueron numeradas de la siguiente manera:

- 1.- *L. delbrueckii*
- 2.- *L. bulgaricus*
- 3.- *L. helveticus*
- 4.- *L. acidophilus*
- 5.- *L. casei*
- 6.- *L. casei* subsp *tolerans*
- 7.- *L. casei* subsp *pseudopiantarum*
- 8.- *L. xylosus*
- 9.- *L. plantarum*
- 10.- *L. coryniformis* subsp *coryniformis*
- 11.- *L. coryniformis* subsp *torquens*
- 12.- *L. fermentum*
- 13.- *L. cellobiosus*
- 14.- *L. coprophilus*
- 15.- *L. fructivorans*
- 16.- *L. desidiosus*

ESPECIES	C	F	Ga	Gg	L	M	M'	N	O	S	X
1	-	+	+	-	-	d	-	-	-	-	-
2	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3	-	#	+	-	+	+	-	-	-	-	-
4	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
5	-	+	+	-	+	(d)	+	-	-	+	-
6	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
7	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
8	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
9	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	d
10	-	+	+	-	-	+	+	-	-	d	-
11	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
12	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	d
13	-	+	+	+	#	+	-	-	-	-	d
14	-	0'	+	+	-	+	-	-	-	-	+
15	-	+	#	+	-	#	-	-	-	-	-
16	-	#	#	+	-	-	-	-	-	-	0'

Los símbolos usados son: += reacción positiva; d= algunas cepas +, otras -; -= reacción negativa; ()= reacción retardada; #= débil o negativa; 0'= no ensayado; C= catalasa; - F= fructosa; G=glucosa; L= lactosa; M= maltosa; M'= manitol; N= nitratos; O= oxidasa; S= sorbitol; X= xilosa; a= ácido; g= gas.

**CAPITULO V**

**CONCLUSIONES Y/O COMENTARIOS**

El presente trabajo se ha realizado en base a estudiar-cualitativamente las especies de Lactobacillus presentes - en heces y su frecuencia. En este sentido de las 150 mues-tras estudiadas, en 54 no se obtuvo ninguna especie de Lac-tobacillus, en el resto de las 96 se aislaron una o más es-pecies de estos microorganismos (tabla No. 1).

Divididas las heces en procedentes de lactantes, 39 - - muestras y pacientes con más de tres años de edad, 111 - - muestras, resultaron positivas a Lactobacillus, 20 de las-primeras y 76 de las segundas, obteniéndose 27 cepas de - lactantes y 111 de no lactantes (tablas No. 2 y 3). Tanto en un caso como en el otro, el grupo homofermentativo pre-domina claramente sobre el heterofermentativo. Siendo L.-casei subsp pseudoplantarum, L. acidophilus y L. desidiosus las especies más frecuentemente aisladas. Atendiendo pre-cisamente a su mayor o menor incidencia, se clasificaron - los lactobacilos en tres grupos: frecuentes, poco frecuen-tes y raros (tabla No. 4).

Los antimicrobianos ensayados han sido algunos de los - usualmente utilizados por vía oral. Llama la atención la-resistencia del 100% de las 40 cepas estudiadas al ácido - nalidixico, sulfametoxazol-trimetoprim y trisulfa y el 72.5% a la eritromicina. Aplicando estos resultados al ser vivo

podría especularse con la no incidencia de disbacteriosis por destrucción de Lactobacillus cuando se emplean estas sustancias. Por el contrario ampicilina, cloranfenicol, neomicina y penicilina son los más activos sobre estos microorganismos, por lo que también podría especularse con su mayor influencia en dichos cuadros de disbacteriosis especialmente con el empleo de ampicilina y neomicina.

Diversas medidas pueden instaurarse para prevenir la disbacteriosis por antibióticos entre ellas la administración de microorganismos habituales de la flora intestinal normales tales como los Lactobacillus que se han utilizado desde muy antiguo en forma de yogurt, kefir y leches fermentadas. Las tres especies más frecuentes serían las más útiles para obtener preparados estabilizadores de flora.

Comparando los resultados con trabajos previos (2,3), se nota una gran diferencia en los mismos, la cual puede estar relacionada con la dieta y cuadro base, que como se sabe varía de un país a otro.

Los medios de cultivo que se utilizaron en el presente trabajo dieron magníficos resultados notándose que el agar Jugo de tomate sobresale del caldo microinoculación más agar, encontrándose 87 cepas aisladas en el primero y 69 -

en el segundo, difiriendo los resultados con los trabajos ya mencionados, en los cuales utilizaron el medio de Man--Rogosa-Mitchell, esta diferencia puede ser debida a la no-similitud en componentes de los mismos. De esto se concluye que el agar jugo de tomate en el presente trabajo es el medio selectivo ideal para el aislamiento de las especies más frecuentes en nuestro medio.

Con respecto de las muestras reportadas como negati-vas, solamente se pudieron seguir 15 pacientes de 54, en-contrándose que ellos estuvieron bajo tratamiento con los siguientes medicamentos: amoxil, nitrofurazona, flagyl, -vermox, penpi K, flagenase, neomicina, cloranfenicol, furazolidona, etc. Lo cual confirma que la ausencia de esta -flora es debida a la acción de los medicamentos de uso - oral, los cuales son usados indiscriminadamente por el pe-diatra y la madre. Lo cual nos hace concluir que la mayo-ría de las veces se causa un problema quizá mayor que el - que presentaba el paciente.

## CAPITULO VI

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alais, Ch.: CIENCIAS DE LA LECHE (PRINCIPIOS DE TECNICA LECHERA). México, C.E.C.S.A., 1984, pp: 267-302.
- 2.- Baca, P.; Cortés, M.C.; Ocete, M.D.; Castillo, A.; Román, J.; Liébana, J.; Piédrola, G., y Maroto, M.C.: - ESTUDIO DEL GENERO Lactobacillus EN HECEs. Laboratorio, 80 (477), 1985, pp: 177-186.
- 3.- Baca, P.; Ocete, M.D.; Cortés, M.C.; Román, J.; Castillo, A.; Liébana, J.; Maroto, M.C., y Piédrola, G.: SEM SIBILIDAD DE Lactobacillus AISLADOS EN HECEs A LOS ANTI MICROBIANOS DE USO ORAL. Laboratorio, 80 (477), 1985, - pp: 187-194.
- 4.- Bailey-Scott y Finegold-Martín: DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO. 6a. edición, Buenos Aires, Ed.Médica Panamericana, 1983, pp: 314,336-338.
- 5.- Bowman, W.C. y Rand, M.J.: FARMACOLOGIA (BASES BIOQUIMICAS Y PATOLOGICAS). 2a. edición, México, Nva.Ed. Interamericana, 1984, pp: 34.17-34.22.
- 6.- Buchanan, R.E. & Buchanan, E.D.: BACTERIOLOGY. 5a. edición, New York, The Macmillan Company, 1951, pp: 319- - 321.
- 7.- Buchanan, R.E. & Gibbons, H.E.: BERGEY'S MANUAL OF DE- - TERMINATIVE BACTERIOLOGY. 8a. edición, Baltimore, The -



Williams & Wilkins Company, 1975, pp: 576-593.

- 8.- Carlsson, J. and Gothefors, L.: TRANSMISSION OF Lactobacillus jensenii AND Lactobacillus acidophilus FROM - MOTHER TO CHILD AT TIME OF DELIVERY. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 1, No. 2, 1975, pp: 124-128.
- 9.- Cowan y Steel's: MANUAL PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA MEDICA. 2a. edición, México. C.-E.C.S.A., 1979.
- 10.- Davis, Dulbecco, Eisen, Ginsberg: TRATADO DE MICROBIOLOGIA. 3a. edición, Barcelona, Salvat Editores, S. A.-1984, pp: 26-37.
- 11.- Dodds, K.L. and Thompson-Collins, D.L.: CHARACTERISTICS OF NITRITE REDUCTASE ACTIVITY IN Lactobacillus lactis - TS4. Canadian Journal of Microbiology, 31(6), 1985, - pp: 558.
- 12.- Ducluzeau, R. y Raibaud, P.: LA FLORA MICROBIANA DEL TUBO DIGESTIVO: COMPOSICION, EQUILIBRIO Y EFECTO SOBRE EL HUESPED. Laboratorio, 75(447), 1983, pp: 323-333.
- 13.- Esteban Marquez de Prado, J.M.; Esteban y Bernáldez, J. M., y García Alvarez, M.: TRASTORNOS QUE LA TERAPEUTICA ANTIMICROBIANA PUEDE PRODUCIR SOBRE LA FLORA INTESTINAL Y SU REPERCUSION EN LA EVOLUCION DE LAS PARASITOSIS DI-

- GESTIVAS Y EN LA PATOLOGIA. Temas Proctológicos, 1968, pp: 141-143.
- 14.- Frazier, W.C.: MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS. 2a. edición, España, Ed. Acribia, 1972.
- 15.- Frobisher, M.: FUNDAMENTALS OF MICROBIOLOGY. 8a. edición, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1968, pp: = 430-432.
- 16.- Garrod, L.P.; Lambert, H.P., y O'Grady, F.: ANTIBIOTICO Y QUIMIOTERAPIA. 5a. edición, Barcelona, Salvat Editores, S.A., 1985, pp: 13-38, 41-45, 63-100, 84-85, - 88-89, 165-179, 195-196, 204-205, 220-230.
- 17.- Gasser, F. and Janvier, M.: DEOXIRIBONUCLEIC ACID HOMOLOGIES OF Lactobacillus jensenii, Lactobacillus leichmani, AND Lactobacillus acidophilus. Int. J.Syst. Bacteriol., 30(1), 1980, pp: 28-30.
- 18.- Goodman & Gilman: LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA. 6a. edición, México, Ed. Médica Panamericana, - 1982, pp: 1087-1101, 1106, 1112, 1129, 1153, 1197- 1198, 1200- 1204.
- 19.- Goth, A.: FARMACOLOGIA MEDICA. 9a. edición, España, - Ediciones Doyma, S.A., 1979, pp: 564-570.
- 20.- Holt, J.G.: THE SHORTER BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATI

- VE BACTERIOLOGY. Baltimore, The Williams & Wilkins - Company, 1977.
- 21.- Johnson, J.L.; Phelps, C.F.; Cummins, C.S.; London J, and Gasser, F.: TAXONOMY OF THE Lactobacillus acidophilus GROUP. Int. J. Syst. Bacteriol., 30(1), 1980, pp: 53-68.
- 22.- Joklik, W.K. e Willet, H.P.: ZINSSER MICROBIOLOGY. - 16a. edición, New York, Appleton-Century-Crofts, pp: 409-410.
- 23.- Joklik, W.K.; Willet, H.P., y Amos, D.B.: ZINSSER MICROBIOLOGIA. 18a. edición, Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana, 1986, pp: 60-65.
- 24.- Katzung, B.G.: FARMACOLOGIA BASICA Y CLINICA. 2a. Edición, México, Ed. El Manual Moderno, 1986, pp: 531-543, 552-559, 584-585.
- 25.- Koneman, Allen, Dowell y Sommers: DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO. Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana, - 1983, pp: 155-156, 292, 337-338.
- 26.- Lennette, Balows, Hausler y Truant: MICROBIOLOGIA CLINICA. 3a. edición, Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana, 1982, pp: 533-537.
- 27.- MacFaddin, J.F.: BIOCHEMICAL TEST FOR IDENTIFICATION-

- OF MEDICAL BACTERIA. 2a. edición, Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1980, pp: 36-41, 51-58, 183-194, 236-244, 249-258.
- 28.- Mackie & McCartney, Duguid/Marmion/Swain: MEDICAL MICROBIOLOGY. Thirteenth ed., Vol. 1, Edinburgh, Ed. Churchill Livingstone, 1978, pp: 263-266.
- 29.- MANUAL BIOXON. México, Bioxon de México, S.A. de C.V., pp: 59.
- 30.- MANUAL DIFCO. 10a. edición, Detroit, DIFCO Laboratories, pp: 1005-1006, 1073-1074.
- 31.- Meyers, F.H.; Jawetz, E., y Goldfien, A.: FARMACOLOGIA CLINICA. 5a. edición, México, Ed. El Manual Moderno, 1982, pp: 521-522, 542-543, 560-564.
- 32.- Nakamura, L.K.: Lactobacillus amylovorus, A NEW STARCH HYDROLYZING SPECIES FROM CATTLE WASTE-CORN FERMENTIONS. Int. J. Syst. Bacteriol. 31(1), 1981, pp: 56-63.
- 33.- Nolte, W.A.: MICROBIOLOGIA ODONTOLOGICA. 3a. edición, México, Ed. Interamericana, 1982, pp: 112-113, 208-209, 295-296, 497-500.
- 34.- Pumarola, A.; Rodríguez-Torres, A.; García-Rodríguez, J.A., y Piédrola-Angulo, G.: MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA MEDICA. México, Salvat Editores, S.A., 1984, --

pp: 155-156, 184.

- 35.- Smith, D.T.; Conant, N.F.; Beard, J.W.; Willet, H.P.; Overman, J.R.; Brown Jr., I.W.; Sharp, D.G., y Poston, M.A.: BACTERIOLOGIA DE ZINSSER. 2a. edición, México. - Unión Tipográfica Ed. Hispano Americana, 1960, pp: 136-139, 586-590.
- 36.- Smith, L. Ds. y Williams, B.L.: THE PATHOGENIC ANAEROBIC BACTERIA. 2a. edición, Springfield-Illinois, Charles C. Thomas Publisher, 1984, pp: 60-61.
- 37.- Topley and Wilson's: PRINCIPLES OF BACTERIOLOGY, VIROLOGY AND IMMUNITY. 5a.edición, Vol. 1, Great Britain,- Butler & Tanner Ltd., 1975, pp: 956-975.
- 38.- Topley and Wilson's: PRINCIPLES OF BACTERIOLOGY, VIROLOGY AND IMMUNITY. 7a. edición, Vol. 2, Great Britain, Butler & Tanner Ltd., 1984, pp: 204-210.