



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

“CONSERVACIÓN DE CEPAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA,  
ECOLÓGICA Y EN ALIMENTOS, UN MÉTODO ALTERNATIVO  
EFICAZ, SENCILLO Y ECONÓMICO”.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

### PRESENTA

PQFB RICARDO GIOVANNI SORIA HERRERA

### ASESOR

QFB RICARDO VEGA TAVERA

### CO-ASESOR

QFB KARLA GABRIELA DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ

MORELIA, MICHOACÁN; NOVIEMBRE 2010.



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL  
LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA MÉDICA DE  
LA FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA DE LA  
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

QFB RICARDO VEGA TAVERA

Y

QFB KARLA GABRIELA DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ

---

*“El otro día descubrí que ha hecho Dios*

*frente al ataque de los antibióticos:*

*¡Bacterias mutantes!”*

Jaime Sabines

## AGRADECIMIENTOS

---

Francamente creo que si por mi fuera esta tesis llevaría mas agradecimientos que información, pero creo que los dos son importantes.

Durante esta grandiosa experiencia llamada universidad y la conclusión del presente trabajo; hay personas que se merecen un sin fin de agradecimientos, ya que sin su valiosa aportación no hubiera sido posible la realización del proyecto que culminó con esta tesis; pero sobre todo mi agradecimiento es por haber dejado una huella en mi camino que me acompañará por el resto de mi vida.

Primeramente me gustaría agradecer a mis padres Rubén e Irma por su incondicional apoyo a lo largo de mi vida, a mis hermanos Rubí, Jonathan y Onil les agradezco infinitamente todo su apoyo.

A mi abuela Josefina por su cariño y comprensión así como a mis tíos y primos.

Agradezco de sobremanera a la QFB Karla Domínguez y al QFB Ricardo Vega por haberme dado la oportunidad de aprender de ellos, así como de sus regaños y consejos para poder conocer la satisfacción de ver terminada esta tesis.

A mis queridos ayudantes Karina, Gerardo “cacho”, Lorena, Claudia, Julio y a todos aquellos instructores del laboratorio de microbiología que en algún momento de su servicio social lavaron tubos e hicieron cientos de tapones de algodón que ayudaron en el transcurso del proyecto, gracias.

Al Biólogo Juan Luis Jaimes por transmitirme sus conocimientos, pero sobre todo por enseñarme ética y moral en el quehacer diario de un microbiólogo.

A la D.C. Silvia Giono por interesarse en nuestro trabajo y apoyarnos con su conocimiento y amistad.

A mi tutor el D.C. Carlos Cortés gracias por su apoyo, sin él este trabajo estaría incompleto.

A la QBP Alicia Gómez por creer en nuestro trabajo y compartir con nosotros su gran experiencia y conocimientos.

A la QFB Sandy Suárez le agradezco todos sus regaños y conocimientos que me han servido de una manera muy especial.

A mis compañeros y amigos del Servicio Social Andrés, Octavio, Aldo, Víctor Hugo, Diana y Mariana de los cuales he aprendido mucho.

A mis grandes camaradas (sin estricto orden) Emiliano, Jorge, Gina, Mónica, Irina, Celeste, Alma, banda, Robe, Ximena, Pollo, Julio, Nive, Hagen, Ala, Figo, Cone, Gerardo, Irvin, Jesús...

También debo agradecerle a don Alfredo “el velas” quien soportó todas las veces que nos traspasamos en la noche trabajando en el laboratorio.

Finalmente al Amor de mi vida Gracias...

## ÍNDICE

---

	<b>PÁGINA</b>
<b>I. ABREVIATURAS</b>	ix
<b>II. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	x
<b>III. ÍNDICE DE TABLAS</b>	xiii
<b>IV. RESUMEN</b>	xv
<b>1. INTRODUCCION</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	1
2.1 Historia de la conservación	1
2.2 Métodos de conservación	3
2.2.1 Métodos de conservación a largo plazo	3
2.2.1.1 Liofilización	3
2.2.1.2 Métodos de congelación	4
2.2.2 Métodos de conservación a corto plazo	5
2.2.2.1 Transferencia periódica a temperatura ambiente	5
2.2.3 Métodos restringidos	7
2.2.3.1 Bolitas de Alginato	7
2.2.3.2 Agua destilada estéril o agua de mar estéril	7
2.2.3.3 Deseccación en papel filtro	7
2.2.3.4 Granos de sal gruesa para Halófilos	8
2.2.3.5 Suelo estéril	8
2.3 Plásmidos de resistencia	8
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	9
<b>4. HIPÓTESIS</b>	9
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	10

5.1 Objetivos particulares	10
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>12</b>
6.1 Material Biológico	12
6.2 Tierra preparada estéril	12
6.3 Cristalería	14
6.4 Medios de cultivo	14
6.5 Equipos	16
6.6 Insumos	16
6.7 Metodologías	17
6.7.1 Conservación	17
6.7.1.1 Preparación del suelo	17
6.7.1.2 Inoculación	18
6.7.2 Pruebas de Viabilidad	20
6.7.2.1 Recuperación	20
6.7.2.2 Nefelometría	20
6.7.2.3 Método de Milles & Misra modificado	20
6.7.2.4 Pruebas metabólicas	21
6.7.3 Aspectos moleculares	22
6.7.3.1 Extracción de Plásmidos	22
6.7.3.2 Lisis alcalina	22
6.7.4 Susceptibilidad antimicrobiana “Método de Kirby-Bauer”	23
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>25</b>
7.1 Método de conservación	25
7.2 Viabilidad	26
7.3 Pruebas de metabolismo Bioquímico	26

7.4 Cepas de Importancia clínica	27
7.4.1 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	27
7.4.2 <i>Shigellas</i>	30
7.4.2.1 <i>Shigella dysenteriae</i>	31
7.4.2.2 <i>Shigella boydii</i>	35
7.4.3 Genero <i>Protea</i> (Providencias)	38
7.4.3.1 <i>Providencia rettgeri</i>	38
7.4.3.2 <i>Providencia stuartii</i>	42
7.4.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 28925	45
7.4.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	49
7.5 Cepas de importancia en alimentos	53
7.5.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	53
7.5.2 <i>Escherichia coli</i>	57
7.5.3 <i>Bacillus cereus</i>	61
7.5.4 <i>Bacillus subtilis</i>	65
7.5.5 <i>Bacillus coagulans</i>	69
7.6 Cepas de importancia ecológica	72
7.6.1 <i>Bacillus mycoides</i>	72
7.6.2 <i>Bacillus megaterium</i>	75
7.6.3 <i>Bacillus badius</i>	78
7.6.4 <i>Bacillus</i> spp.	81
7.6.5 <i>Paenibacillus alvei</i>	84
7.6.7 <i>Listeria monocytogenes</i>	87
7.6.8 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90
7.7 Análisis estadístico de la estabilidad metabólica	93
7.7.1 Cepas de importancia clínica	93

7.7.2 Cepas de importancia alimentaria	94
7.7.3 Cepas de importancia ecológica	95
7.8 Análisis de DNA plasmídico	96
7.9 Evaluación de resistencia a antibióticos	98
7.9.1 Cepas de importancia clínica	98
7.9.2 Cepas de importancia en alimentos	99
7.9.3 Cepas de importancia ecológica	100
<b>8. CONCLUSIONES</b>	101
<b>9. ANEXOS</b>	102
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	112

---

Palabras clave

Conservación, alternativa, método, bacterias, suelo, Importancia clínica, ecológica, alimentos

---

I. - Abreviaturas

- WFCC World Federation of Culture Collection
  - CECT Colección Española de Cultivos Tipo
  - FELACC Federación Latinoamericana de Cultivos Tipo
  - WDCM World Data Center of Microorganisms
  - ATCC American Type Culture Colection
  - M & M Método de Milles & Misra, 1938
  - ETA Enfermedades de Transmisión Alimentaria
  - DMS Dimetil Sulfóxido
  - CBHI Caldo Infusión Cerebro Corazón (Brain Heart Infusion)
  - CST Caldo Soya Trypticaseína
  - CMH Caldo Müller-Hinton
  - µl Microlitro
  - UFC Unidad formadora de colonia
  - °C Grados centígrados
  - EDTA Acido dietilendiaminotetraacético
  - SDS Dodecilsulfato sódico
-

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

### PÁGINA.

---

<b>FIGURA 1</b>	Diseño general del experimento	11
<b>FIGURA 2</b>	Comparación del inóculo inicial con un nefelómetro de MacFarland	19
<b>FIGURA 3</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	28
<b>FIGURA 4</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	30
<b>FIGURA 5</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Shigella dysenteriae</i>	31
<b>FIGURA 6</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Shigella dysenteriae</i>	34
<b>FIGURA 7</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Shigella boydii</i>	35
<b>FIGURA 8</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Shigella boydii</i>	37
<b>FIGURA 9</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Providencia rettgeri</i>	38
<b>FIGURA 10</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Providencia rettgeri</i>	41
<b>FIGURA 11</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Providencia stuartii</i>	42
<b>FIGURA 12</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Providencia stuartii</i>	44
<b>FIGURA 13</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 28952	45
<b>FIGURA 14</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 28953	48
<b>FIGURA 15</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Listeria monocytogenes</i>	49
<b>FIGURA 16</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Listeria monocytogenes</i>	52
<b>FIGURA 17</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Listeria monocytogenes</i>	54
<b>FIGURA 18</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Listeria monocytogenes</i>	56
<b>FIGURA 19</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Escherichia coli</i>	57

<b>FIGURA 20</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Escherichia coli</i>	60
<b>FIGURA 21</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Bacillus cereus</i>	61
<b>FIGURA 22</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Bacillus cereus</i>	64
<b>FIGURA 23</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Bacillus subtilis</i>	66
<b>FIGURA 24</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Bacillus subtilis</i>	68
<b>FIGURA 25</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Bacillus coagulans</i>	69
<b>FIGURA 26</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Bacillus coagulans</i>	71
<b>FIGURA 27</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Bacillus mycoides</i>	72
<b>FIGURA 28</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Bacillus mycoides</i>	74
<b>FIGURA 29</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Bacillus megaterium</i>	75
<b>FIGURA 30</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Bacillus megaterium</i>	77
<b>FIGURA 31</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Bacillus badius</i>	78
<b>FIGURA 32</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Bacillus badius</i>	80
<b>FIGURA 33</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Bacillus</i> spp	81
<b>FIGURA 34</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Bacillus</i> spp.	83
<b>FIGURA 35</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Paenibacillus alvei</i>	84
<b>FIGURA 36</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Paenibacillus alvei</i>	86
<b>FIGURA 37</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Listeria monocytogenes</i>	87
<b>FIGURA 38</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Listeria monocytogenes</i>	89
<b>FIGURA 39</b>	Gráfico de viabilidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90
<b>FIGURA 40</b>	Análisis de la morfología macro y microscópica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	92
<b>FIGURA 41</b>	Análisis estadístico del porcentaje de estabilidad metabólica y	93

porcentaje de mutaciones de las cepas de importancia clínica.

<b>FIGURA 42</b>	Análisis estadístico del porcentaje de estabilidad metabólica y porcentaje de mutaciones de las cepas de importancia alimentaria.	94
<b>FIGURA 43</b>	Análisis estadístico del porcentaje de estabilidad metabólica y porcentaje de mutaciones de las cepas de importancia ecológica.	95
<b>FIGURA 44</b>	Electroforesis de las cepas antes de la conservación.	96
<b>FIGURA 45</b>	Electroforesis de las cepas después de la conservación.	97
<b>FIGURA 46</b>	Evaluación de la resistencia a los antibióticos de cepas de importancia clínica.	
<b>FIGURA 47</b>	Evaluación de la resistencia a los antibióticos de cepas de importancia en alimentos.	
<b>FIGURA 48</b>	Evaluación de la resistencia a los antibióticos de cepas de importancia ecológica.	

### III. INDICE DE TABLAS

#### PÁGINA.

---

<b>TABLA 1</b>	Fórmula de la gelosa especial	6
<b>TABLA 2</b>	Composición química típica de la perlita	13
<b>TABLA 3</b>	Composición típica de la turba	13
<b>TABLA 4</b>	Pruebas bioquímicas utilizadas en este experimento	21
<b>TABLA 5</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	29
<b>TABLA 6</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Shigella dysenteriae</i>	33
<b>TABLA 7</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Shigella boydii</i>	36
<b>TABLA 8</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Providencia rettgeri</i>	40
<b>TABLA 9</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Providencia stuartii</i>	43
<b>TABLA 10</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
<b>TABLA 11</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Listeria monocytogenes</i>	51
<b>TABLA 12</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Listeria monocytogenes</i>	55
<b>TABLA 13</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Escherichia coli</i>	59
<b>TABLA 14</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Bacillus cereus</i>	63
<b>TABLA 15</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Bacillus subtilis</i>	67
<b>TABLA 16</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Bacillus coagulans</i>	70
<b>TABLA 17</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Bacillus mycoides</i>	73
<b>TABLA 18</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Bacillus megaterium</i>	76
<b>TABLA 19</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Bacillus badius</i>	79
<b>TABLA 20</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Bacillus</i> spp.	82
<b>TABLA 21</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Paenibacillus alvei</i>	85
<b>TABLA 22</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Listeria monocytogenes</i>	88
<b>TABLA 23</b>	Pruebas bioquímicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91

#### IV. RESUMEN

En el presente estudio se estableció un método de conservación a largo plazo, eficaz y económico, que mantuvo la viabilidad, pureza y estabilidad de cepas, y se determinó si el medio de cultivo utilizado al momento de la recuperación afecta en la viabilidad y estabilidad de las cepas conservadas. Para lo anterior, se conservaron 19 cepas de distintos géneros y especies bacterianos donados por el laboratorio de microbiología de la Facultad de Químico Farmacobiología con estabilidad, pureza y viabilidad comprobadas, preservadas con el método de “conservación en suelo modificado estéril pH 5.5-6” desde el mes de marzo del 2009; se monitoreo en un periodo de cada dos meses hasta la fecha, utilizando 3 medios diferentes para su recuperación. Las cepas se mantuvieron estables de un 95 a 100%; en cuanto a la viabilidad, se observó que los resultados cambiaron según el medio de cultivo elegido para recuperar; el caldo BHI tuvo los mejores resultados de estabilidad y viabilidad de las cepas probadas, al alcanzar resultados de hasta  $10^{-24}$ , la viabilidad en todos los medios fue mayor de  $10^5$ . Se llegó a la conclusión de que el método de conservación en “tierra preparada estéril” es un método económico ya que los materiales utilizados son básicos para cualquier laboratorio y su almacenamiento es a temperatura ambiente, es eficaz en la conservación de cepas de origen clínico, ecológico y de alimentos.

## 1. INTRODUCCIÓN

Una de las áreas más importantes de la Microbiología es la conservación de cepas, estas son resguardadas en ceparios o colecciones microbianas cuyo objetivo fundamental es preservar, clasificar, documentar y estudiar los cultivos microbianos para emplearlos en las diversas áreas como lo son la industria, el área biotecnológica, el área clínica, ecológica, docencia, investigación así como áreas de interés específico.

Las colecciones o ceparios almacenan cultivos microbianos mediante diversos métodos, siendo los más comunes la liofilización, la criopreservación, la transferencia periódica y en casos muy particulares algunos métodos restringidos para algunas especies. La importancia de estos centros es inmensa ya que ponen a disposición de los diversos usuarios las cepas de microorganismos que requieren en sus labores específicas.

Los servicios que se ofrecen por estos ceparios o colecciones microbianas, no es únicamente almacenar las cepas también extienden los servicios de aislamiento, depósito, selección, identificación y clasificación de cepas; así como dar asesorías, seminarios, cursos de enseñanza, publican manuales y catálogos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Historia de la conservación.

A lo largo de la historia los microorganismos, se han desarrollado varias líneas de investigación en donde estos, juegan un papel importantísimo dentro de la evolución del hombre; han participado en procesos tan antiguos como la fermentación del vino o la elaboración del pan; así como también, han sido la causa de millones de muertes en pandemias como la peste o el cólera; pero no fue sino hasta el descubrimiento del microscopio y su perfeccionamiento que se desarrollo la ciencia de la Microbiología, este microcosmos que hasta ese momento era desconocido para la humanidad pero tan necesario para el progreso de la misma.

Muchos grandes hombres han participado en el desarrollo de la microbiología e inclusive muchos de ellos murieron en el cumplimiento del glorioso deber microbiológico, tratando de descubrir las causas de las millones de muertes de padecimientos tan comunes como

lo eran la difteria, la polio, la viruela, el carbunco, la rabia, etc. Padecimientos que año con año terminaban con la vida de miles de personas.

Gracias a estos grandes hombres que arriesgando su vida lograron entender las funciones básicas y fundamentales de los microorganismos, así como sus usos y aplicaciones en beneficio de la humanidad como lo son las vacunas y los antibióticos es así que nace la conservación de cepas como una necesidad de utilizar estos microorganismos para diversos usos y aplicaciones.

Así en 1880 en la ciudad de Praga, Viena Frántisek Král observó la necesidad de conservar microorganismos y creó el primer catálogo de microorganismos que mantuvo por 21 años; posteriormente surgieron diversas colecciones dentro de las más importantes en 1906, por la asociación internacional de botánicos en Baarn, Holanda en 1906, la colección del Commonwealth Mycological Institute del Reino Unido en 1919 y en Estados Unidos la American Type Culture Collection (ATCC).

Estas colecciones han aumentado considerablemente y actualmente existen 469 colecciones en 61 países registrados en el WDCM (Centro de Datos Mundial de Microorganismos) cubren todas las áreas microbiológicas disponibles sin embargo hay muchas colecciones establecidas no registradas sustentadas por gobiernos, universidades o industrias.

El establecimiento de organizaciones mundiales, regionales y nacionales ha favorecido la interacción y colaboración entre las colecciones. Ejemplos de ello son la federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivo (FELACC) y la máxima organización que representa las colecciones de cultivos: la Federación Mundial de Colecciones de Cultivo (World Federation Culture Collection, WFCC) fundada en 1963 que tiene como responsabilidad promover y propiciar el desarrollo de las colecciones de cultivos de microorganismos y cultivos celulares. [Fernández-concha et. al. 2009]

En México se encuentran registradas 15 colecciones distribuidas en el país; por otra parte la FELACC cuenta con 44 colecciones registradas y con un número de cepas de 51,303 al 2010. Sin embargo, aún existen en México muchas colecciones en desarrollo que no han sido registradas y que contienen grandes cantidades de información sobre microorganismos. [Floccari M. et al 2010].

## 2.2 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN.

### 2.2.1 Conservación a largo plazo.

#### 2.2.1.1 Liofilización.

La liofilización es un método a largo plazo eficaz que se puede aplicar para la conservación no solo de microorganismos sino también de alimentos; se conservan con gran facilidad bacterias, actinomicetos, levaduras y con algún grado de variación pueden ser sometidos a liofilización fagos y virus, pero no siendo así para hongos filamentosos. Este método consiste en la eliminación del agua por medio de la sublimación a presión reducida; durante el proceso se puede perder gran cantidad de las células debido a la formación de cristales de hielo, esto se evita utilizando medios de soporte en el cual se suspende al microorganismo, esto ayuda en la formación de una pastilla que facilita la eliminación de agua de forma homogénea.

Los medios de soporte son muchos y muy variados los más comunes son:

- a) Proteosa peptona glicerol para congelar  
Proteosa peptona, 0.5%; NaCl, 0.5%; Glucosa, 0.5%; Glicerol, 15%; autoclave 10 lb, 15 min.; pH 7.5
- b) Caldo glucosa 7.5%  
Caldo nutritivo, 400mL; Glucosa anhidra, 30 g; autoclave 10 lb, 10 min.; pH 7.6
- c) Caldo Inositol 5%  
Caldo nutritivo, 400mL; Inositol, 5%, autoclave 10 lb, 15 min.
- d) Suero glucosado mezcla desecante,  
Suero estéril de caballo, 300 ml; Glucosa, 30 g; caldo nutritivo, 1.3 g; Agua destilada, 100 ml. Se esteriliza por filtración.
- e) Suero glucosado  
Suero estéril de caballo, 400 ml.; Glucosa (dextrosa anhidra), 30 g. Se esteriliza por filtración.

Debemos tener en cuenta que la elección del tipo de soporte dependerá del microorganismo a conservar y que para inocular previa liofilización los microorganismos deberán estar en fase de crecimiento logarítmico los cuales se introducen en viales, ampollas o tubos con una etiqueta al interior que contenga los datos del microorganismo y se colocan en charolas de liofilización para refrigerar previo a la liofilización para descender la temperatura lentamente, posterior a eso se recomienda bajar la temperatura rápidamente con alcohol-cetona y hielo seco para alcanzar la congelación.

Se recomienda llevar la deshidratación hasta obtener un 2% de humedad residual, una vez obtenida la pastilla, esta se sella y se almacena en oscuridad a temperatura ambiente. Es importante mantener un registro detallado de las bacterias conservadas. [Giono S., 2009]

Este es un método altamente efectivo tomando las consideraciones necesarias para su mantenimiento podríamos afirmar que es el mejor método de conservación sin embargo; el equipo, al igual que los soportes son costosos, por lo cual no es posible que todos los laboratorios puedan adquirir un liofilizador o mantener un cepario con esta técnica así como también, el adquirir cepas liofilizadas tiene alto costo; debemos considerar también que una manipulación errónea al momento de trabajarse pueden ocasionar graves pérdidas tanto de microorganismos como económicas.

### **2.2.1.2 Métodos de congelación.**

Los métodos de congelación para la preservación de microorganismos son básicamente la ultra congelación a temperaturas entre -20 y -70 °C y la criopreservación que es otro método de conservación en donde se congela a temperaturas bajas de nitrógeno líquido (fase de vapor -140 °C y fase líquida -192 °C) favoreciendo la viabilidad y la estabilidad genética.

Estos métodos son altamente efectivos y se pueden conservar bacterias, hongos, virus, fagos e inclusive algunos protozoos y células humanas; estas últimas llegan a sobrevivir largos periodos de tiempo debido al considerable descenso del metabolismo; sin embargo, se deben monitorear ampliamente algunos factores que pueden afectar considerablemente la viabilidad y la estabilidad genética como son, el enfriamiento y el calentamiento.

En estos métodos es necesaria la adición de crioprotectores al medio, ya que al momento de la congelación la formación de cristales puede romper las paredes celulares y afectar en un alto grado la preservación del microorganismo. Los crioprotectores más utilizados son:

- a. Dimetil sulfóxido (DMS),
- b. Glicerol,
- c. Leche descremada,
- d. algunos azúcares (glucosa, sacarosa o meso-inositol).

Los principios generales cuando se utilizan métodos de congelación son:

- 1) La velocidad de enfriamiento que debe ser lenta hasta 4°C y después rápida a -70°C
- 2) La velocidad de congelación debe ser rápida.
- 3) La cantidad de electrolitos debe ser mínima.
- 4) Los medios de soporte como el glicerol y el dimetil sulfóxido, sirven para proteger a la bacteria durante estos cambios fisicoquímicos.
- 5) En algunas ocasiones a los medios de soporte se le adicionan azúcares también como protectores.
- 6) Existen bacterias sensibles a la congelación como *Neisseria* y *Haemophilus* y otras resistentes, estas consideraciones deben tomarse en cuenta cuando se utiliza Nitrógeno líquido o cualquier método de congelación [Giono S., 2009].

Los sistemas de congelación por nitrógeno líquido son altamente eficaces pero de costos muy elevados ya que el sistema de nitrógeno completo es caro, y debemos tener en cuenta factores permanentes que podrían afectar la efectividad del método, como lo son el nivel estático del nitrógeno líquido en el tanque o las variaciones de voltaje si se utiliza un sistema REVCO®; así como el mal manejo por parte del personal sin experiencia, todas estas consideraciones hacen que este método solo deba utilizarse en centros de referencia donde se cuenta con los recursos y el personal para manipular al nitrógeno líquido.

## 2.2.2 Métodos de conservación a corto plazo

### 2.2.2.1 Transferencia periódica a temperatura ambiente

Este es el método de conservación más utilizado en ceparios o colecciones pequeñas, ya que es económico debido a que utiliza medios de cultivo comunes de laboratorio para la conservación, a pesar de la sencillez del método es muy importante tener algunas precauciones a la hora de utilizarse.

Suelen emplearse medios de cultivo de marca convencional como lo son la Gelosa Sangre, la Gelosa Nutritiva, el Agar Soya Trypticaseína, Gelosa Chocolate, el Agar Base de Gelosa Sangre; etc. Se utilizan en tubos inclinados con tapón de caucho o rosca. Se sellan con parafina o parafilm después de crecidos. También puede utilizarse especialmente para microorganismos de crecimiento rápido, una fórmula denominada Gelosa Especial que tiene la fórmula siguiente:

---

**Tabla 1. Fórmula: Gelosa Especial**

Base de gelosa sangre	20.0 g.
Peptona	2.5 g.
Agar	15.5 g.
Extracto de carne	1.5 g.
Agua destilada	1000 ml.
pH final	7.4

[Giono S. & col., 2009]

---

Debe tenerse en cuenta que para esta conservación no deben ser utilizados medios de cultivo que contengan algún tipo de inhibidor y su almacenamiento es a temperatura ambiente en oscuridad, también pueden conservarse algunas cepas en refrigeración; siendo ésta una variante del método, pero algunas de las cepas como son *Haemophilus* y

*Neisseria* que son susceptibles a la refrigeración y se pierden fácilmente por resiembras sucesivas, deben ser resembradas constantemente [Giono S. & col., 2009].

Otro aspecto muy importante es que nunca deben emplearse placas de Petri, para conservar ya que la deshidratación es más rápida y es más fácil la contaminación ambiental.

### **2.2.3 Métodos restringidos**

#### **2.2.3.1 Bolitas de Alginato**

En este procedimiento las células se encuentran en una matriz de alginato la cual se deseca mediante el tratamiento con soluciones hipertónicas y posteriormente se hace desecación al aire; estas bolitas se pueden conservar en tubos de vidrio herméticamente cerrados a temperaturas relativamente bajas (4 a 18°C), este método es relativamente efectivo, ya que el alginato le proporciona un soporte a la célula pudiendo bajar la temperatura hasta -70°C en congeladores especiales tipo REVCO® [García M. & col., CECT, 2005].

#### **2.2.3.2 Agua destilada estéril o agua de mar estéril**

Este es un método alternativo bastante utilizado ya que es muy económico pero no todos los microorganismos son preservables por éste método que se emplea principalmente para hongos filamentosos y levaduras; pero que pueden conservarse también algunas bacterias poco exigentes. Este método consiste en suspender en agua estéril una concentración celular en el caso de bacterias y levaduras, y para los hongos filamentosos y no esporulados se puede incluir un trozo pequeño del agar con crecimiento. En el caso de microorganismos marinos o halófilos, se usa el agua de mar diluida estéril en donde se hace la suspensión. Estos tubos se conservan a temperatura ambiente en oscuridad y o en refrigeración arrojando diferentes viabilidades y con una estabilidad genética que podría considerarse como buena; pero hasta la fecha no ha sido comprobada para características específicas como la virulencia o el metabolismo y/o capacidad fermentativa [García M. & col., CECT, 2005].

#### **2.2.3.3 Desecación en papel filtro**

Este método implica la utilización de papel absorbente preferentemente Whatmann del número 3 o 4; al cual se le aplica una suspensión fuerte de más de  $10^8$  células las cuales

se desecan a temperatura ambiente en condiciones estériles o si es posible utilizando un liofilizador si congelación previa de las células para utilizar el vacío y desecar mejor el papel, este se puede forrar con plástico estéril, colocar en bolsas de celofán o plástico tipo Ziploc® y conservar a temperatura ambiente en oscuridad.

#### **2.2.3.4 Granos de sal gruesa para halófilos**

Para su conservación por este método se mezclan las células con sal gruesa y se dejan desecar espontáneamente. Debido a la higroscopicidad de la sal, la desecación no es total, pero las células dejan de multiplicarse por ser insuficiente el nivel de agua disponible.

#### **2.2.3.5 Suelo estéril.**

El método de conservación en suelo estéril siempre se ha tomado como última elección ya que los nutrientes y la humedad son reducidos considerablemente, limitando no solo el metabolismo bacteriano si no también su periodo de vida; además depende de otros factores como el pH, tipo de suelo, compuestos o sustancias contenidos en el suelo e impurezas.

Independientemente del método de conservación que se elija para satisfacer las necesidades de conservación, se debe de tener en cuenta que para la recuperación del microorganismo debe seleccionarse un medio de cultivo muy nutritivo; ya que, el microorganismo ha estado sometido a una alta carga de estrés; una vez que el microorganismo se ha recuperado en sus condiciones metabólicas habituales se deben realizar la pruebas de metabolismo para verificar sus características y su estado fenotípico y genotípico.

### **2.3 Plásmidos de resistencia**

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico circular o lineal, presentes en los organismos procariotas y en algunos eucariotas. Su tamaño varía desde una hasta cientos de kilobases (Kb). Su número también puede variar, dependiendo del tipo, desde una sola copia hasta decenas por célula. Su capacidad de autoreplicación y mantenimiento dentro de la bacteria hospedadora se debe a la existencia de ciertos elementos genéticos involucrados en la replicación plasmídica, los cuales se agrupan en

una unidad genética llamada replicón. El replicón comprende una región de entre dos y tres Kb, que contiene los genes que codifican para las proteínas de control de inicio de la replicación (cop e inc); así como las proteínas involucradas en el inicio de la replicación (rep) y otros elementos de control como RNA antisentido y secuencias específicas de unión de las proteínas que colaboran en el inicio de la replicación [Couturier et al., 1998].

Además del replicón, los plásmidos pueden contener otros genes como los de resistencia a los antibióticos y a los metales pesados, los de degradación de compuestos recalcitrantes o los de utilización de otras fuentes de carbono y energía. Estos genes aportan ventajas selectivas a las bacterias que los portan y les permiten colonizar nuevos nichos ecológicos (Gstalter et al., 2003).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existen varias alternativas para la conservación de microorganismos pero ninguna es eficaz para todos, es debido a esto que los conservacionistas están obligados a seguir investigando en nuevas metodologías que permitan mantener microorganismos por periodos de tiempo más largos y que mantengan las características tanto fenotípicas como genotípicas intactas; así mismo, implementar materiales alternos que reduzcan los costos de la conservación para que laboratorios con menos recursos puedan contar con ceparios eficaces que les permitan mantener microorganismos de referencia para corroborar sus procesos y con esto obtener mejores controles de calidad y a su vez beneficiar a la población que requiera de sus servicios.

### 4. HIPÓTESIS

Dentro de un grupo de aislados bacterianos de importancia clínica, alimentaria y ecológica hay cepas con la capacidad de subsistir en suelo por sus características inocuas y otras con una buena capacidad de adaptación. Utilizando estas capacidades y agregando algunos soportes extras se innovó un método de conservación, incorporando y mejorando dos métodos que se han considerado como una de las últimas opciones para la conservación bacteriana (conservación en suelo y la desecación sobre minerales), esperando obtener un método mejorado a largo plazo eficaz que conserve de un 95 a un 100% sus características fenotípicas y genotípicas; además, de obtener una viabilidad mayor a la esperada y concluyendo si los medios de recuperación influyen en la viabilidad

y de ser así, incorporarlo como un método de rutina para conservación seguro y económico.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Adaptar e innovar un método que se ha tomado siempre como última opción para la conservación bacteriana debido a sus limitaciones; ya que la mayoría de las bacterias mueren en un periodo de tiempo muy corto; de manera que al innovarlo se puedan conservar cepas de microorganismos de importancia clínica, ecológica y en alimentos, de manera eficaz y económica tratando de lograr conservar un abasto de un 90 a un 100% con sus características fenotípicas y genotípicas.

Con lo anterior se pretende que este método sea accesible para laboratorios de investigación, docencia, industrias y sobre todo para laboratorios con recursos limitados del área de la salud.

### 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Innovar un medio de conservación que se ha considerado como la última opción para la conservación bacteriana y que se ha dejado como opción para la conservación de hongos; utilizando tanto la tierra más adecuada, como soportes que permitan al microorganismo reducir al máximo sus cambios metabólicos, sin alterar sus caracteres fenotípicos y genotípicos.
2. Aplicar un método a largo plazo eficaz sencillo y económico, que gracias a sus ventajas y la sencillez de su técnica sea accesible para laboratorios e industrias con interés de conservar las cepas de su rubro a un costo bajo y con excelente viabilidad y pureza de la cepa.

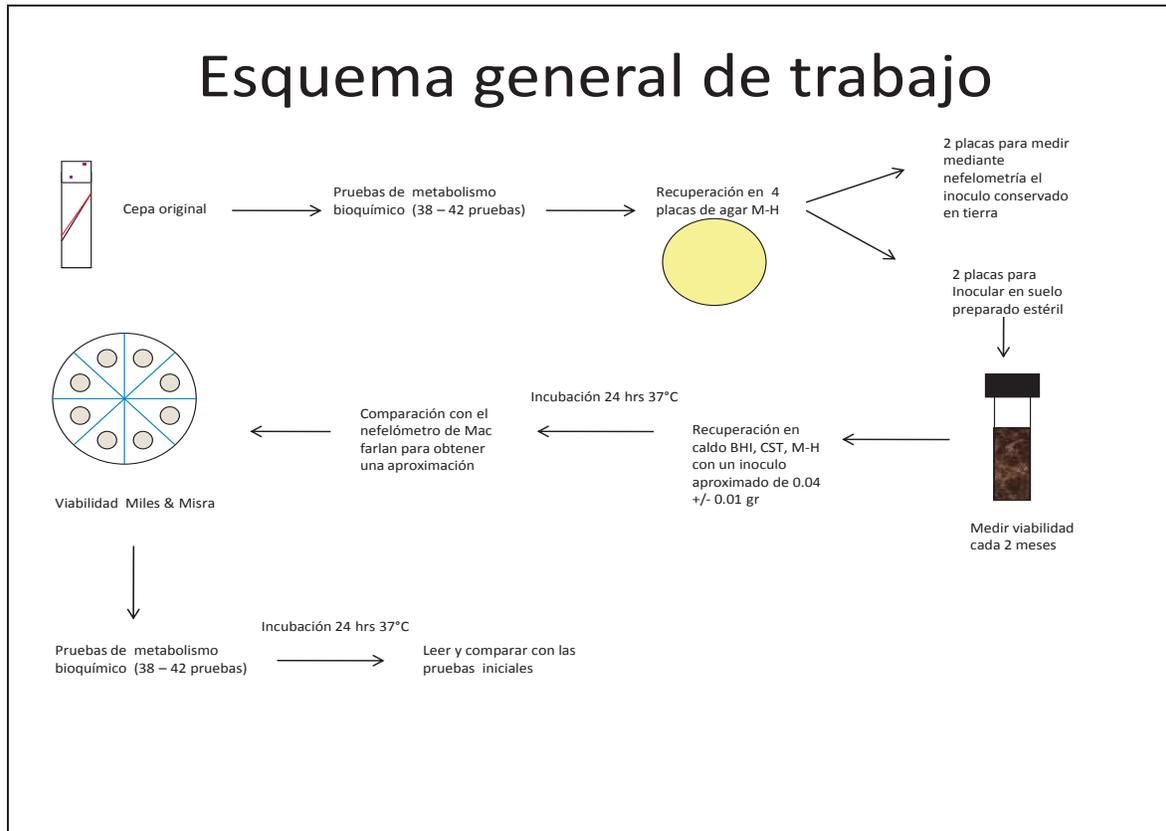


Figura 1. Diseño general del experimento. En esta figura se muestra el esquema general que se llevo a cabo para cada uno de los microorganismos conservados por el método de tierra preparada estéril los cuales se conservaron teniendo cuidado de no realizar el proceso de conservación con géneros bacterianos diferentes ya que es muy fácil que se contaminen. Como soporte se empleo suelo que se preparó y esterilizó por 3 horas; dependiendo de la especie bacteriana, se utilizó una densidad óptica de entre  $10^{-9}$  y  $10^{-10}$ .

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron 19 cepas bacterianas donadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la U.M.S.N.H. las cuales se emplearon para validar el método de conservación en suelo modificado estéril (el cual se innovo), dentro de este grupo de cepas, 2 de ellas fueron cepas de reserva provenientes de la American Type Culture Collection (ATCC) que son las siguientes:

1. *Escherichia coli* ATCC 25923
2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28953
3. *Pseudomonas aeruginosa*
4. *Escherichia coli*
5. *Providencia stuartii*
6. *Providencia rettgeri*
7. *Shigella dysenteriae*
8. *Shigella boydii*
9. *Listeria monocytogenes*
10. *Listeria monocytogenes*
11. *Listeria monocytogenes*
12. *Bacillus subtilis*
13. *Bacillus cereus*
14. *Bacillus mycoides*
15. *Bacillus badius*
16. *Bacillus megaterium*
17. *Bacillus coagulans*
18. *Bacillus* spp.
19. *Paenibacillus alvei*.

### 6.2 SUELO PREPARADO ESTÉRIL

El suelo se prepara con un 66% de un suelo orgánico denominado por algunos como “turba” y un mineral que se denomina “perlita” en una proporción de 34% la cual es extraída de minas en diversos puntos del país, siendo materiales muy económicos y fáciles de adquirir.

El análisis de químico de perlita muestra la siguiente composición:

---

**Tabla 2. Composición típica de la perlita.**

Dióxido de silicio	SiO <sub>2</sub>	70 – 75 %
Óxido de aluminio	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	12 – 15 %
Óxido de sodio	Na <sub>2</sub> O	3 – 4 %
Óxido de potasio	K <sub>2</sub> O	3 – 5 %
Óxido de hierro	Fe <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	0.5 – 2 %
Óxido de magnesio	MgO	0.2 – 0.7 %
Óxido de calcio	CaO	0.5 – 1.5 %
Perdida en el horno de agua químicamente combinada	H <sub>2</sub> O	3 – 5 %

[Quiroz, R. & col 2008]

---

La turba es un material orgánico que constituye la primera etapa del proceso por el que la vegetación se convierte en carbón mineral, el análisis de la composición de la turba muestra el siguiente contenido.

---

**Tabla 3. Composición típica de la turba.**

Carbono	59 %
Hidrógeno	6 %
Oxígeno	33 %
Nitrógeno	2 %
Materias volátiles	60 %

[Pontevedra-Pombal, X. & col 2001]

---

### 6.3 CRISTALERÍA

- Tubos de ensaye de 13X100 con tapón de rosca marca Kimax®
- Tubos de ensaye de 13X75 con tapón de caucho
- Tubos de ensaye de 16X100 con tapón de rosca marca Pyrex®
- Matraces Erlen-Meyer de 125, 250, 500, 1000 y 2000 ml. Marca Kimax®
- Probeta graduada de 100, 500 y 800 ml. Marca Pyrex®
- Pipeta graduada de 1, 2, 5, 10ml. Marca Pyrex®
- Mortero marca Pyrex®
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Pipeta Pasteur de vidrio

### 6.4 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar de Müller-Hinton marca Bioxon®
- Agar nutritivo marca Bioxon®
- Agar Mac Conkey marca Bioxon®
- Agar de Eosina Azul de Metileno marca BD®
- Agar de Soya y Trypticaseína marca Bioxon®
- Agar Cetrimida marca Bioxon®
- Agar para Salmonella y Shigella marca Bioxon®
- Agar Gelosa Sangre marca Bioxon®
- Agar Bilis-Esculina marca BD®
- Agar hierro Triple Azúcar marca Merck®
- Agar Hierro Lisina marca Merck®
- Agar Citrato marca Bioxon®
- Agar Fenilalanina marca Bioxon®
- Agar Movilidad Indol Ornitina
- Caldo Malonato marca Bioxon®
- Caldo Rojo de metilo / Vogues-Proskauer marca Merck®
- Caldo urea marca Bioxon®
- Caldo Infusión Cerebro y Corazón marca Bioxon®
- Caldo Soya Trypticaseína marca Bioxon®
- Caldo Müller-Hinton marca Difco®

- Caldo Nutritivo marca Bioxon®
- Caldo Rojo de Fenol marca BD®
- Agar – Agar marca Dibico®
- Aminoácido Arginina marca Omnicem®
- Almidón soluble marca
- Caseína marca Sigma®
- Gelatina nutritiva marca Bioxon®
- Agar Indol Nitrito marca Bioxon®
- Caldo EC/MUG marca Difco®
- Azúcares marcas (Sigma®, BD®)
  - Arabinosa
  - Dulcitol
  - Fructosa
  - Galactosa
  - Glucosa
  - Glicerol
  - Inositol
  - Lactosa
  - Levulosa
  - Maltosa
  - Manosa
  - Melibiosa
  - Myo-Inositol
  - Rafinosa
  - Ramnosa
  - Ribosa
  - Sacarosa
  - Salicina
  - Sorbitol
  - Trehalosa
  - Xilosa

## 6.5 EQUIPOS

- Incubadora marca Felisa® modelo
- Refrigerador General Electric® modelo turbo plus cooling system
- Autoclave de calor húmedo marca Presto Steele® modelo 21It
- Termo baño marca CIVEQ® modelo HH-1
- Estufa de gas marca SAN-SON
- Lámpara de luz ultravioleta marca Minerallight® modelo UVGL-25
- Nefelómetro de Mac Farland
- Microscopio óptico marca Carl Zeiss® modelo Stanford 25
- Centrifuga marca Sol-Bat® modelo J-600
- Micropipetas marca Biohit® de 10 a 100µl
- Mechero tipo Fisher
- Vortex marca Genie® modelo 2
- Timer marca Control Company®
- Cámara Fotográfica marca Panasonic modelo Lumix®

## 6.6 INSUMOS

- Puntas Amarillas para 100µl
- Puntas Azules para 1000 µl
- Algodón
- Abate lenguas de madera
- Aplicador de madera
- Parafilm®
- Agua destilada
- Discos de Oxidasa marca BBL®
- Discos de antibióticos
  - Sensi-discos de Penicilina 10 UI marca BBL®
  - Sensi-discos de Ampicilina 10µg marca BBL®
  - Sensi-discos de Polimixina B 300 UI marca BBL®
  - Sensi-discos de Ceftazidima 30µg marca BBL®
  - Sensi-discos de Amikacina 30µg marca BBL®
  - Discos de susceptibilidad de Penicilina G 10 UI marca OXOID®

- Discos de susceptibilidad de Gentamicina 10µg marca OXOID®
- Discos de susceptibilidad de Vancomicina 30µg marca OXOID®
- Discos de susceptibilidad de Amoxicilina 10µg marca OXOID®
- Discos de susceptibilidad de Trimetoprim/sulfametoxazol 25µg marca OXOID®
- Discos de susceptibilidad de Cloranfenicol 30µg marca OXOID®

## 6.7 METODOLOGÍA

Se conservaron en suelo estéril las 19 cepas bacterianas durante un periodo de 8 a 12 meses, los cuales fueron monitoreados por periodos bimestrales realizando diversas pruebas de metabolismo bioquímico y al final del experimento se realizó una extracción de plásmidos.

### 6.7.1 Conservación

#### 6.7.1.1 Preparación del suelo

El suelo se preparó agregando un 66.6% de “turba” que es un material orgánico que se toma de las denominadas turberas, que son cuencas lacustres de origen glaciar que actualmente están repletas de material vegetal más o menos descompuesto, rico en carbono de pH ácido. El restante 33.3% lo conformó un mineral denominado “perlita” que es un cristal de sílice que absorbe el agua reteniendo lo necesario, la composición de ambas se observa en las tablas 2 y 3.

Previo a la conservación se preparó la tierra, esta se sometió a esterilización, utilizando un mortero con pistilo para triturar las partículas de perlita e incorporarlas mejor a la tierra. Una vez triturada se distribuyó una porción de 7 gramos en viales de boca ancha de 18X100 y se cerró con tapón de rosca.

Posterior a esto se esterilizó por 3 horas a 15 libras de presión a 121 grados centígrados. Los tubos al salir de la autoclave se cerraron herméticamente y se enfriaron a temperatura ambiente.

### 6.7.1.2 Inoculación

Los tubos viales ya preparados, se inocularon con la cepa que se desea conservar, llevando un control del metabolismo previo a la conservación, realizando todas las pruebas bioquímicas de las que se dispone. En este ensayo se utilizaron de 44 pruebas bioquímicas que se pueden ver en la tabla 4.

Una vez que el metabolismo del microorganismo fue evaluado, se procedió a realizar una siembra en medio de cultivo Agar Müeller-Hinton por estría masiva en 4 placas Petri de 20X100, las cuales se incubaron por 24 h. a 37°C. Transcurrido este tiempo se procedió a la cosecha.

De las cuatro placas petri inoculadas dos de ellas fueron cosechadas con una espátula estéril, en caso de no contar con la espátula se puede sustituir por abate lenguas estériles, raspando la placa se obtuvo la biomasa bacteriana que en condiciones de esterilidad se introdujo en el vial con tierra y se homogenizó con la cucharilla.

Las placas restantes se utilizaron para medir el inóculo bacteriano, mediante nefelometría utilizando tubos estériles, en los cuales se inoculó en agua destilada el contenido en biomasa del cultivo, se homogeniza y se introduce una alícuota a una celda para ser leída a 600 nm. En caso de no contar con este equipo se utilizó un nefelómetro de Mc Farland, con el cual se comparó el inóculo para obtener un abasto aproximado de  $10^{-15}$  células vivas, inoculadas inicialmente en la tierra. Así como tener un índice de comparación confiable para el final del experimento (ver figura 2).

Microorganismo	Comparación con el nefelómetro de MacFarland	Equivalente en UFC
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	15	$1.8 \times 10^{-10}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 28953	16	$2.4 \times 10^{-10}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	$1.8 \times 10^{-10}$
<i>Escherichia coli</i>	17	$2.7 \times 10^{-10}$
<i>Providencia stuartii</i>	15	$1.8 \times 10^{-10}$
<i>Providencia rettgeri</i>	15	$1.8 \times 10^{-10}$
<i>Shigella dysenteriae</i>	10	$3 \times 10^{-9}$
<i>Shigella boydii</i>	11	$6 \times 10^{-9}$
<i>Listeria monocytogenes</i>	18	$3 \times 10^{-10}$
<i>Listeria monocytogenes</i>	18	$3 \times 10^{-10}$
<i>Listeria monocytogenes</i>	18	$3 \times 10^{-10}$
<i>Bacillus subtilis</i>	20	$9 \times 10^{-10}$
<i>Bacillus cereus</i>	20	$9 \times 10^{-10}$
<i>Bacillus mycoides</i>	20	$9 \times 10^{-10}$
<i>Bacillus badius</i>	20	$9 \times 10^{-10}$
<i>Bacillus megaterium</i>	20	$9 \times 10^{-10}$
<i>Bacillus coagulans</i>	20	$9 \times 10^{-10}$
<i>Bacillus</i> spp.	20	$9 \times 10^{-10}$
<i>Paenibacillus alvei</i> .	20	$9 \times 10^{-10}$

Figura 2. Comparación de inoculo inicial con un nefelómetro.

Una vez realizadas estas pruebas y obteniendo la concentración de la biomasa el tubo de tierra inoculado se almacenó en un lugar fresco a temperatura ambiente de preferencia en obscuridad con papel parafilm® en la rosca, durante un periodo de dos meses.

## 6.7.2 PRUEBAS DE VIABILIDAD

### 6.7.2.1 Recuperación

A los dos meses de inoculado el tubo se le hicieron pruebas de viabilidad utilizando para su recuperación tres caldos de cultivo convencionales que son:

- Caldo Brain Heart Infusion (BHI)
- Caldo Soya Trypticaseína (CST)
- Caldo Müeller-Hinton (CMH)

En estos tres caldos se inoculó aproximadamente de 0.03 a 0.05 gramos de la tierra inoculada; lo cual se realizó en condiciones de esterilidad cerrando los tubos y se homogeniza con el caldo de cultivo para después incubar por 24 horas a 37 °C.

### 6.7.2.2 Nefelometría

A las 24 h. de incubado el caldo de cultivo se debe realizar un comparativo con el nefelómetro de Mc Farland para obtener un dato previo a la prueba de viabilidad.

### 6.7.2.3 Método de Milles & Misra modificado

Para medir la viabilidad se utilizó el método modificado de Milles & Misra [Miles, A.A & Misra, S.S (1938). J. Hyg. (London), 38, 732;

En un área limpia y aséptica se procedió a marcar las divisiones en las placas, haciendo ocho divisiones por placa, rotulando con el nombre del microorganismo y el tipo de caldo usado para la recuperación.

En seguida se realizaron 24 diluciones, en las cuales se tomó un inóculo de 100 µl del caldo de recuperación y se introdujo al tubo 1 de los caldos de dilución, utilizando un vortex® en la velocidad 2 se homogenizó y se tomó 100µl del tubo uno para pasarlos al tubo 2 homogenizando nuevamente. Sucesivamente se repitió este paso hasta llegar a la dilución 24.

Transcurrido este tiempo se procedió a inocular las placas con 15µl de los tubos de dilución, de cada octeto de placa comenzando por la dilución 24 hasta la dilución 1 y

homogenizando con el vortex cada tubo antes de la inoculación. Una vez inoculadas las placas se acercan al mechero para secar el caldo y evitar que se corra alterando los resultados, ya secas las placas se cerraron y se incubaron a 37°C durante 24 h, una vez transcurrido este tiempo, se reportaron las UFC en la dilución más alta las cuales se multiplicaron por el inverso de la dilución y así se obtuvo el número aproximado de células vivas en el método de conservación.

$$UFC = C * X10^X * Y$$

#### 6.7.2.4 Pruebas metabólicas

Una vez reportado el resultado de las UFC se verificó el estado metabólico de las cepas conservadas, utilizando pruebas bioquímicas convencionales, para ratificar que la cepa no tuviera mutaciones considerables, al grado de expresar un gen o inhibir otros durante la conservación. Estas características las medimos utilizando las siguientes pruebas:

**Tabla 4. Pruebas bioquímicas utilizadas en el experimento.**

CONVENCIONALES	AZUCARES			OTROS	
Agar TSI	Arabinosa	Levulosa	Sacarosa	Tinción Gram	Gelatina
Agar LIA	Dextrosa	Maltosa	Salicina	Tinción de Esporas	Arginina
Agar Citrato	Dulcitol	Manitol	Sorbitol	Oxidasa	Caseína
Agar Fenilalanina	Fructosa	Melibiosa	Trehalosa	Catalasa	Almidón
Agar MIO	Galactosa	Myo-Inositol	Xilosa	Bilis-Esculina	Red. De Nitratos
Caldo Malonato	Glicerol	Rafinosa		Prueba de CAMP	OF glucosa
Caldo Rojo de Metilo	Inositol	Ramnosa		Voges-Proskauer	
Caldo Urea	Lactosa	Ribosa		β-Glucoronidasa	

**TSI: Hierro Triple Azúcar; LIA: Agar de Hierro Lisina; MIO: Movilidad Indol Ornitina;  
CAMP: Pruebas de Cristie-Atkins-Munch-Peterson; OF: Oxido-Fermentación**

Estas pruebas llevaron controles de calidad tanto de medios de cultivo como de microorganismos; ya que sólo así se podía marcar una diferencia fenotípica de los microorganismos conservados en suelo, también se llevó un registro muy detallado de todas estas actividades en bitácoras que nos permitió acceder a estos datos de una manera rápida y eficaz.

### **6.7.3 Aspectos moleculares**

#### **6.7.3.1 Extracción de plásmidos**

Después de realizadas las pruebas de metabolismo bioquímico se procedió a la búsqueda de plásmidos en las bacterias para validar la utilización del método de conservación, para lo cual se recuperaron de la tierra en caldo soya tripticaseína y con un hisopo estéril se paso con estría masiva a placas de Agar soya tripticaseína y se incubaron por 24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se recuperó la biomasa en micro-viales eppendorf® y se sometieron a la extracción de plásmidos por el método de lisis alcalina [Anderson N. 1997].

#### **6.7.3.2 Lisis Alcalina**

El aislamiento de ADN plasmídico de bacterias es una rutina común en laboratorios de investigación. Utilizando el método de Lisis Alcalina de células bacterianas es posible obtener el ADN de una forma rápida y sencilla.

Procedimiento:

1. En un micro-vial eppendorf® se suspendió el cultivo bacteriano fresco en caldo LB® con antibióticos y se centrifugó por 1 minuto a 12,000 rpm. Retirando el sobrenadante.
2. Se repitió el paso 1 en el mismo tubo, llenando el tubo de nuevo con más cultivo bacteriano y centrifugando durante 1 minuto. Se retiró el líquido sobrenadante del tubo
3. Se añadió 200 µl de solución 1 fría con una micropipeta

- Solución 1 contiene glucosa, Tris y EDTA. La glucosa se añade para aumentar la presión osmótica fuera de las células. Tris es un agente tampón para mantener un pH constante (= 8.0). EDTA protege el ADN de las enzimas de degradación (llamado DNAsas); EDTA se une a cationes bivalentes que son necesarios para la actividad DNAsa.
4. Se añadió 400 µl de la solución 2, cerrando los tubos e invertir 5 veces con suavidad y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
    - Solución 2 contiene NaOH y SDS (detergente). La mezcla alcalina rompe las células, y el detergente rompe la membrana lipídica y solubiliza proteínas celulares. NaOH también desnaturaliza el ADN en hebras simples.
  5. Se añadió 300 µl de solución 3, se invirtió 5 veces con suavidad, se incubaron los tubos en hielo durante 10 minutos.
    - Solución 3 contiene una mezcla de ácido acético y acetato de potasio. El ácido acético neutraliza el pH, permitiendo que las hebras de ADN a renaturalizar. El acetato de potasio también precipita la SDS de la solución, junto con los restos celulares.
  6. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante se pasó a otro micro-vial. Tratando de evitar tomar cualquier precipitado blanco durante la transferencia. Está bien dejar un poco de sobrenadante para evitar que accidentalmente se tome el precipitado.
  7. Se rellenó el resto del micro-vial con isopropanol. El tubo se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
  8. Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 12,000 rpm. Un precipitado lechoso debe estar en el fondo del tubo. el sobrenadante se retiró sin volcar el sedimento.
  9. Se añadió 1 ml de etanol al 70% frío. Se Tapó el tubo y mezcló invirtiendo varias veces. Se centrifugó los tubos durante 1 minuto. Se vertió el líquido sobrenadante (con cuidado de no volcar el precipitado).
  10. Se dejó secar el tubo durante 5 minutos. Se añadió 50 µl de TE al tubo. Si era necesario. El DNA quedó listo para la electroforesis o se preservó a -20°C.

#### **6.7.4 Susceptibilidad antimicrobiana “método de Kirby-Bauer”**

Actualmente existen varios métodos para probar la susceptibilidad “In Vitro” de bacterias a los diversos antibióticos. El más utilizado es el método originalmente descrito por Bauer et al., (Método de Kirby-Bauer). Este es el método de difusión en disco en que se han desarrollado estándares para su interpretación y está apoyado por datos clínicos y de laboratorio.

Procedimiento:

Se colocaron entre 4 y 5 ml de suero fisiológico estéril en un tubo de ensayo. Se tomó con asa bacteriológica tres ó cuatro colonias morfológicamente similares y se suspendieron en el tubo hasta alcanzar una turbidez comparable a la solución de Mc Farland 0.5. Luego de preparado el inóculo bacteriano con la cepa en estudio se siguieron los siguientes pasos:

1. Introducir el hisopo estéril en el inóculo bacteriano preparado, de manera de embeberlo completamente. Antes de retirarlo se debe escurrir sobre las paredes del tubo para retirar el exceso de líquido del mismo.
2. Sembrar la placa de MH de manera de obtener un crecimiento confluyente, para lo cual se estría con el hisopo en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repite el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más. Deben extremarse los cuidados en sembrar las placas de borde aborde, porque de lo contrario pueden haber problemas en la realización de las lecturas.
3. Dejar secar 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.
4. Colocar los discos. Estos deben ser colocados con dispensador o pinza estéril. Luego de estar sobre el agar se debe presionar los discos levemente para que queden adheridos al mismo. Deben estar a más de 15 mm del borde de la placa y deben distribuirse de manera de que no haya superposición de los halos de inhibición. En las placas de 150 mm no se colocarán más de 12 discos, y en las placas de 100 mm no es aconsejable colocar más de 6.
5. Luego de colocados los discos las placas deben incubarse a 35°C a 37°C en grupos no mayores a cinco placas durante 18 hs. Para detectar la metilicilinoresistencia las placas deben incubarse 24 horas completas. Las placas deben colocarse en forma invertida para que el agua condensada no caiga sobre el agar, lo que cambiaría las condiciones del medio y por lo tanto no serviría para la lectura de los halos.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se conservaron por el método de tierra preparada estéril 19 cepas bacterianas las cuales se identificaron bioquímicamente con 44 pruebas metabólicas. Bimestralmente se cuantificó la viabilidad de estas cepas por el método de Milles & Misra modificado [Miles, A.A. & Misra, S.S., 1938] [J. Hyg. (London), 1938]; de los 19 aislados de diferente procedencia, un grupo de ellos, inocuas de tierra mostraron viabilidades cercanas al 100% de la escala de este ensayo.

Los aislados de origen clínico, mostraron conservar factores de virulencia, así como en la mayoría de los casos conservaron plásmidos, de igual manera se conservaron la mayoría de las características metabólicas después del periodo de conservación.

### 7.1 Método de conservación

El método de preservación en suelo siempre ha sido utilizado para la conservación de hongos filamentosos y se ha intentado utilizar para la conservación bacteriana con poco éxito ya que las bacterias no se lograban habituar en suelos normalmente utilizados para los hongos, además de que como resultado de este intento de conservación se presentaban un sin número de mutaciones.

Esta modificación del método de conservación en suelo consiste en utilizar una tierra rica en fuentes de carbono, adicionada con un mineral de sílice que al momento de calentarla se hace porosa lo cual permite que las bacterias inoculadas se desequen sobre el mineral reduciendo así su metabolismo al mínimo y utilizando las fuentes de carbono en la tierra puede conservarse por largos periodos de tiempo.

En la composición de esta tierra preparada podemos observar la presencia de un alto contenido de carbón como principal componente; este último es utilizado por los microorganismos como soporte y detoxificante lo cual les permiten mantenerse viables en condiciones metabólicas hostiles.

El mineral añadido a su vez, retiene el agua desecando el medio por lo cual al incorporar a las bacterias, estas son atraídas por el agua contenida en el interior del mineral, formando adherencias, introduciéndose y/o desecándose en el mismo, reduciendo también su contenido de agua al mínimo para mantenerse viables.

Una vez preparada la tierra es importante que el proceso de esterilización sea mantenido durante 3 horas para garantizar la esterilidad del suelo, debido a que en las turberas de donde se obtiene la turba para la conservación, existe una gran variedad de microorganismos como bacterias, virus, protozoarios y hongos filamentosos que podrían alterar la conservación con contaminaciones mixtas.

Al momento de inocular la biomasa del microorganismo que se desea conservar mediante este método, no deben realizarse simultáneamente la conservación para géneros bacterianos distintos ya que es muy fácil que se contaminen y se alteren los resultados de la conservación.

## 7.2 Viabilidad

Para medir la viabilidad, previamente se utilizaron tres caldos de recuperación, CBHI, CST, CMH los cuales contienen diferentes cantidades de nutrientes, siendo el caldo BHI el más nutritivo pero no siempre el preferido por los microorganismos, que en algunos casos prefieren caldos de recuperación que no contengan tantos nutrientes sino más bien nutrientes específicos.

Las viabilidades obtenidas cada bimestre y cuantificadas con el método de Miles & Misra modificado, mostraron resultados con viabilidades mucho más elevadas en comparación de otros métodos utilizados de manera habitual, lo cual nos muestra que el método es funcional para la conservación de bacterias de diferentes géneros. Hasta el momento, los géneros probados en este método han soportado de manera aceptable y eficiente la conservación.

De los aislados en los que mayor viabilidad se obtuvo, fueron los géneros que podemos encontrar de forma inocua en la tierra: *Bacillus*, *Listeria*, *Pseudomonas*, los cuales por sus características inocuas tienden a resistir más las condiciones adversas como son la desecación, la reducción de nutrientes en el medio y la supervivencia en condiciones hostiles.

## 7.3 Pruebas de metabolismo bioquímico

Los resultados de las pruebas de metabolismo bioquímico, mostraron en algunos de los microorganismos cambios que pueden ser significativos, esto se muestra marcadamente en los microorganismos entéricos aislados de muestras clínicas principalmente; los

cambios se hicieron visibles en el metabolismo fermentativo de los azúcares, ya sea que los fermente en una forma lenta o los deje de fermentar.

Los resultados en estas pruebas no variaron en sus metabolismos más básicos, sino en pruebas muy específicas las cuales pueden indicar mutaciones puntuales pequeñas.

## 7.4 CEPAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA

### 7.4.1 *Escherichia coli* ATCC 25922

El género *Escherichia* pertenece al grupo de los bacilos gram negativos fermentadores oxidasa negativos, *Escherichia coli* es la especie bacteriana más recuperada en laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que afectan casi cualquier tipo de de tejido y sistema orgánico humano.

También es uno de los microorganismos más frecuentemente involucrados en la sepsis por gram negativos y en el shock inducido por endotoxinas. Otras infecciones recurrentemente causadas por *E. coli* son las de vías urinarias y heridas, además de la neumonía en pacientes inmunosuprimidos y meningitis en recién nacidos [Konneman & col., 2006].

La importancia de esta cepa como tal en el área clínica es inmensa ya que ha sido la bacteria más estudiada a lo largo de los años y es útil en muchos procesos y controles de calidad por parte de los laboratorios por lo que es de vital importancia conservarla con sus características intactas para poder tener siempre una cepa de referencia.

Se conservó durante un periodo de 8 meses una cepa de *Escherichia coli*, inoculada en suelo preparado estéril; en esta cepa, cada bimestre fueron monitoreadas sus características metabólicas así como su viabilidad; y lo anterior arrojó los siguientes resultados:

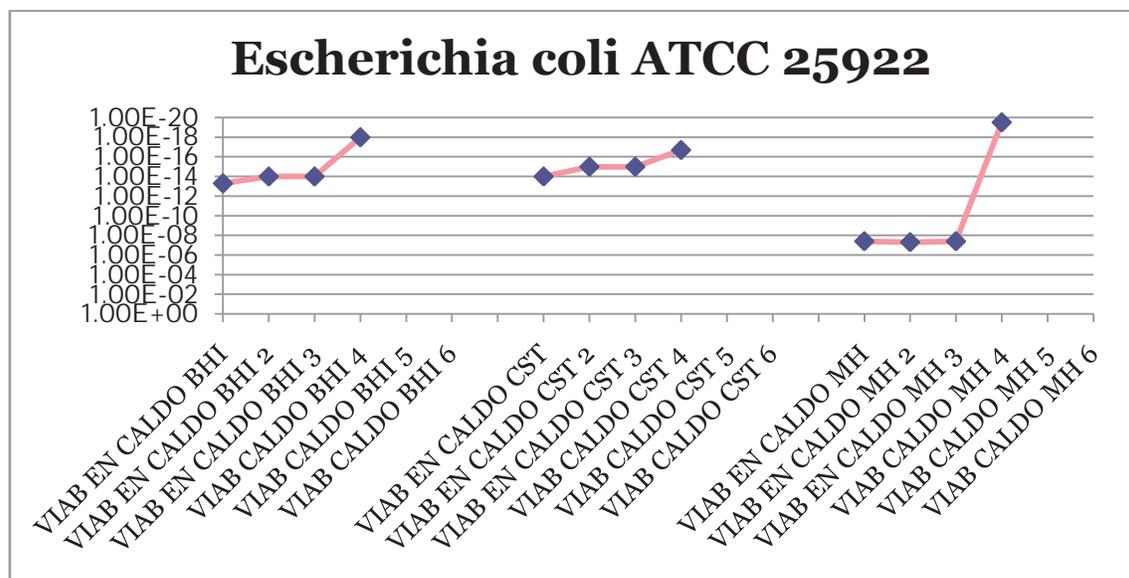


Figura 3. Gráfico de viabilidades de *Escherichia coli* ATCC 25922

Los resultados obtenidos para *Escherichia coli* ATCC 25922 conservado durante un periodo de 8 meses durante los cuales la viabilidad obtenida en cada bimestre arrojó los siguientes resultados:

Caldo BHI:  $10^{-13}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-14}$  y  $10^{-18}$ .

Caldo ST:  $10^{-14}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-17}$

Caldo M-H:  $10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-19}$

En este gráfico se observa que la cepa se mantuvo estable en cuanto a crecimiento, prefiriendo para su recuperación el CST y el CBHI y aún que en el último experimento el CMH tuvo un despunte en el crecimiento de las células bacterianas, que oscilaban entre el 30% y que al último bimestre llegaron al 80%.

Se realizaron pruebas de metabolismo de diversos aminoácidos, azúcares así como enzimáticas para determinar la estabilidad y la pureza del microorganismo conservado en suelo preparado estéril, lo cual arrojó los siguientes resultados:

Tabla 5. Pruebas bioquímicas de *Escherichia coli* ATCC 25922

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			
Gram	-	Arabinosa	+
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	-	Fructosa	+
Lactosa	+	Galactosa	+
Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	+	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	+	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	+
Fenilalanina	-	Manitol	+
Movilidad	+	Melibiosa	+
Indol	+	Myo-Inositol	-
Ornitina	+	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	+
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	-	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	+
Bilis-Esculina	-	Trehalosa	+
Nitratos	+	Xilosa	+
Gelatina	+	β-Glucuronidasa	+
Voges-Proskauer	+		

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento final			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			
Gram	-	Arabinosa	+
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	-	Fructosa	+
Lactosa	+	Galactosa	+
Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	+	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	+	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	+
Fenilalanina	-	Manitol	+
Movilidad	+	Melibiosa	+
Indol	+	Myo-Inositol	-
Ornitina	+	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	+
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	-	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	-	Trehalosa	+
Nitratos	+	Xilosa	+
Gelatina	+	β-Glucuronidasa	+
Voges-Proskauer	+		

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; N/E: Prueba no ensayada.

Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas para *Escherichia coli* ATCC 25922 revisadas en la literatura solo muestran una variable en el azúcar sorbitol el cual ya no fue utilizado por el microorganismo.

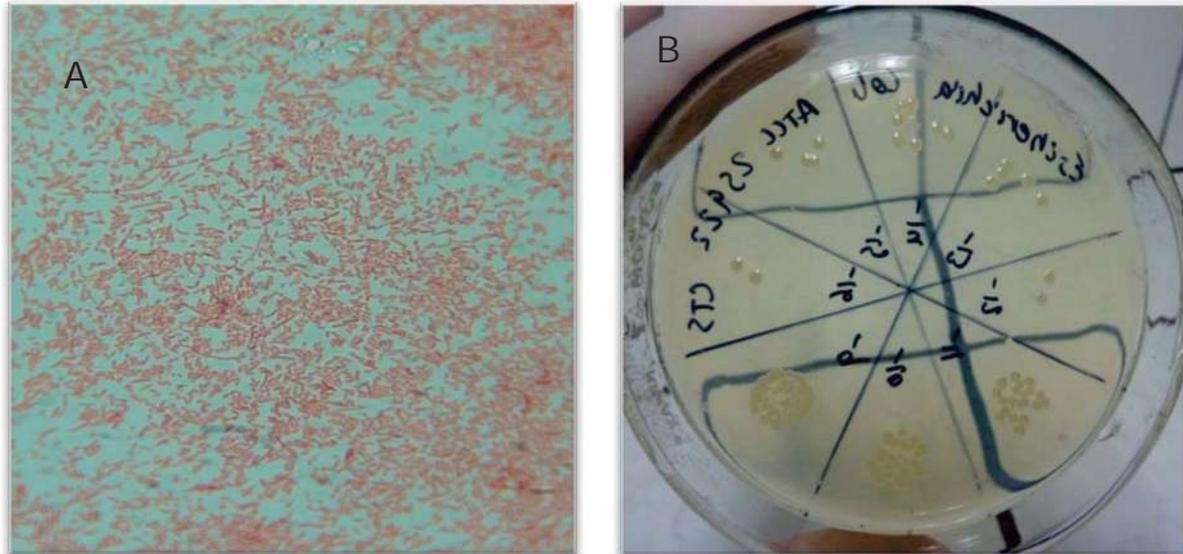


Figura 4. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Escherichia coli* ATCC 25922  
A. tinción gram de *Escherichia coli* ATCC 25922; B. Viabilidad de *Escherichia coli* ATCC 25922 después de 8 meses de conservación.

---

#### 7.4.2 Género *Shigella*.

El género *Shigella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, con 4 especies reconocidas: *S. dysenteriae* (Shiga 1896), *S. flexneri* (Flexner 1900), *S. sonnei* (Sonne 1915) y *S. boydii* (Boyd 1938). Se divide en los serotipos: 12, 15, 1 y 18.

El número anual de episodios de *Shigella* a lo largo del mundo se estima en 164,7 millones, de los cuales 163,2 millones se dieron en los países en vías de desarrollo (con 1,1 millones de muertos) y 1,5 millones en países industrializados. El 69 % de todos los episodios y el 61 % de todas las muertes atribuibles a la *shigellosis* abarcó a niños de menos de 5 años. [Mena A. & col 2010]

El género *Shigella* puede sospecharse en cultivos porque son no fermentadoras de lactosa y tienden a ser bioquímicamente inertes. En los casos típicos no producen gas a

partir de hidratos de carbono, con excepción de de ciertos biogrupos de *S. flexneri* que son aerogénicos. Pocas cepas de *S. sonnei* pueden fermentar lentamente la lactosa (2%) y la sacarosa (1%) y la mayoría de las cepas pueden descarboxilar la ornitina, características no compartidas por otras cepas de *Shigella* [Konneman & col 2006].

Para este experimento se conservaron dos cepas de *Shigella* que son la *S. dysenteriae* y la *S. boydii*, las cuales después de ocho meses de conservación por el método de tierra preparada estéril, en los cuales se graficó el tiempo de conservación contra el inverso de la dilución lo cual se representa en los siguientes gráficos:

#### 7.4.2.1 *Shigella dysenteriae*

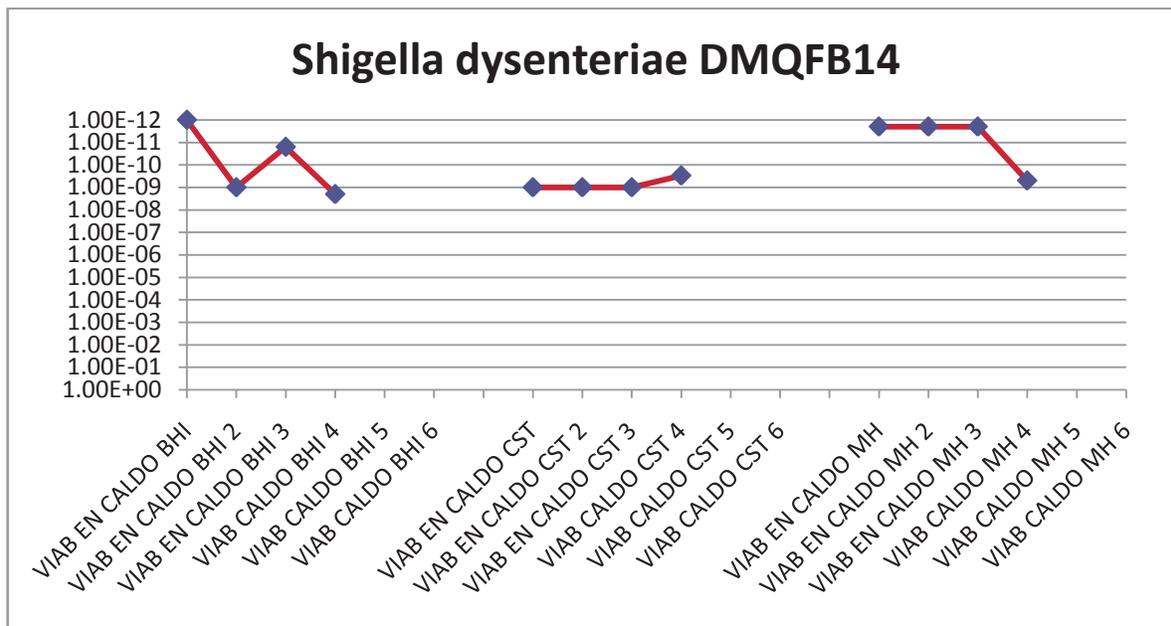


Figura 5. Gráfico de viabilidad de *Shigella dysenteriae*

Los resultados obtenidos en la viabilidad de este microorganismo en un periodo de 8 meses fueron:

Caldo BHI:  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$

Caldo ST:  $10^{-9}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$

Caldo M-H:  $10^{-12}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$

Durante la conservación de la cepa de *Shigella dysenteriae* se observó que sus viabilidades oscilan entre el 30 y el 50% en la escala de este ensayo, después de la recuperación en los caldos BHI y MH, mientras que se mantuvo estable frente a la recuperación del caldo CST en la cual tuvo un ligero incremento.

En general la cepa tubo una viabilidad estable en un rango de hasta el 50% lo cual en cualquier método de conservación para este tipo de cepas entéricas es muy bueno, si lo comparamos con la congelación que nos da un rango de aproximadamente  $10^{-6}$  con lo cual el resultado indica que la cepa es viable en este método.

Posterior al ensayo probamos sus características metabólicas lo cual arrojó los siguientes resultados antes de la conservación y al final del experimento:

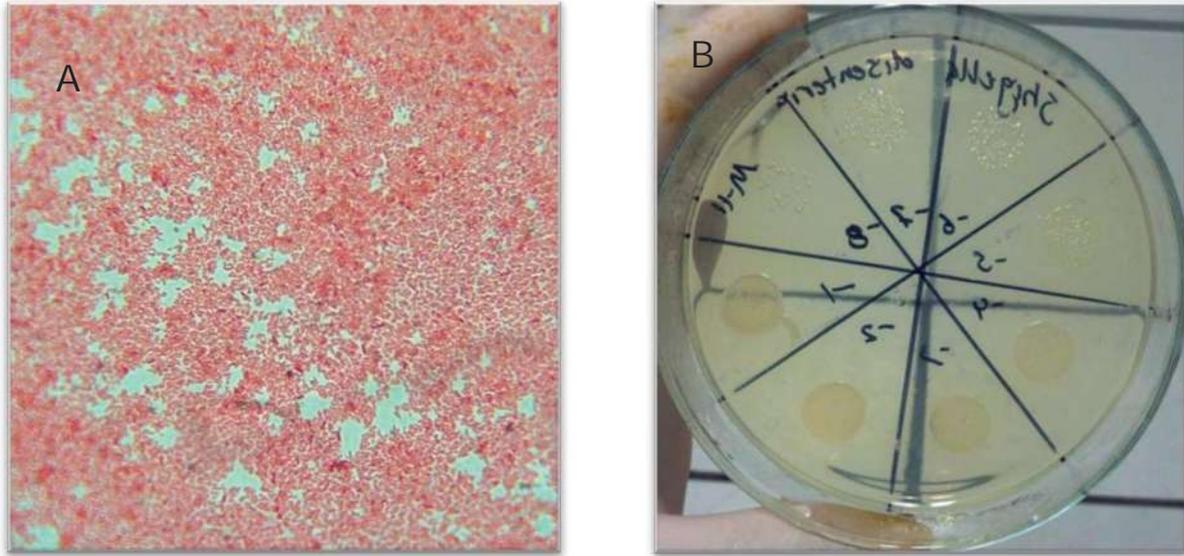
Tabla 6. Pruebas bioquímicas de *Shigella dysenteriae*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicia			
<i>Shigella dysenteriae</i>			
Gram	-	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	-	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	+
Glucosa	+	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	-	Manosa	+
Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	--	Melibiosa	-
Indol	+	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	-	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	-	Trehalosa	+
Nitratos	+	Xilosa	-
Gelatina	-	β-Glucoronidasa	N/E
Voges-Proskauer	-		

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento final			
<i>Shigella dysenteriae</i>			
Gram	-	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	-	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	+
Glucosa	+	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	-	Manosa	+
Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	-	Melibiosa	-
Indol	+	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	+
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	-	Salicina	+
Almidón	N/E	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	-	Trehalosa	+
Nitratos	+	Xilosa	-
Gelatina	-	β-Glucoronidasa	N/E
Voges-Proskauer	-		

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; N/E: Prueba no ensayada.

Los resultados de las pruebas bioquímicas obtenidas para el microorganismo *Shigella dysenteriae* muestran 3 variaciones notables, dejando de producir ácido a partir de la Trehalosa y fermentando la Ramnosa y la salicina.



**Figura 6. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Shigella dysenteriae***  
A. Tinción gram de *S. dysenteriae* después de la conservación; B. Viabilidad de *S. dysenteriae* después de 8 meses de conservación.

---

#### 7.4.2.2 *Shigella boydii*

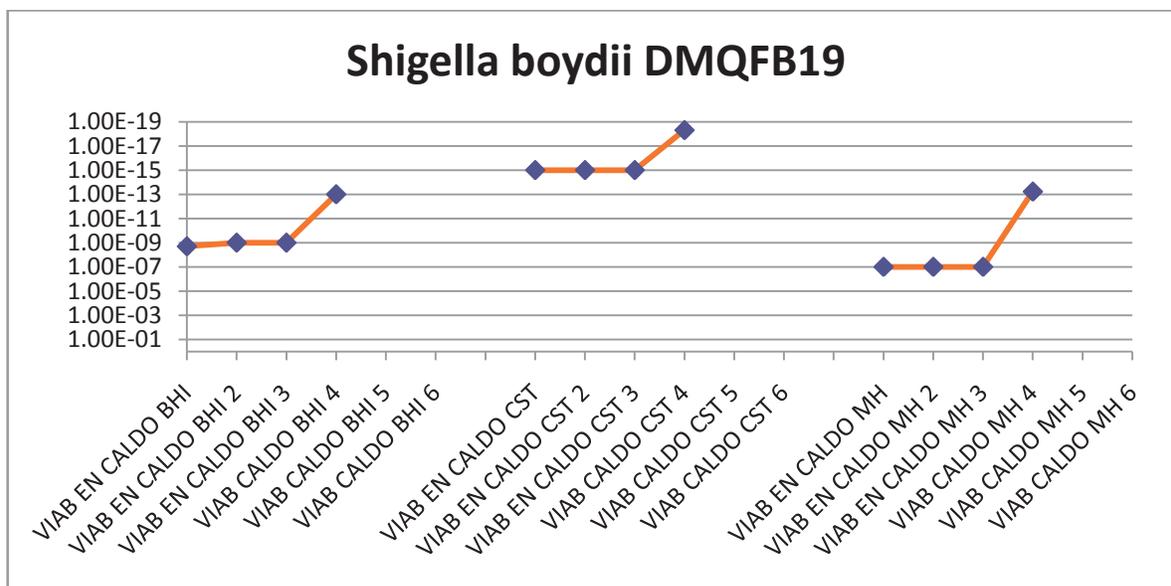


Figura 7. Gráfico de viabilidad de *Shigella boydii*

Los resultados obtenidos por la segunda cepa del género *Shigella* conservada durante 8 meses y reportadas bimestralmente son los siguientes:

Caldo BHI:  $10^{-9}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-13}$

Caldo ST:  $10^{-15}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-18}$

Caldo M-H:  $10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-13}$

Los datos arrojados por la cepa *Shigella boydii* posterior a la conservación en tierra preparada estéril, obtuvo viabilidades de entre el 40 y 80% de la escala de este ensayo, marcadamente más que *Shigella dysenteriae* en el mismo tiempo de conservación, particularmente en la recuperación del CST, manteniendo sus características fenotípicas particularmente en buen estado lo cual se muestra en las tablas bioquímicas.

Tabla 7. Pruebas bioquímicas de *Shigella boydii*.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial			
<i>Shigella boydii</i>			
Gram	-	Arabinosa	+
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	-	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	+
Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	-	Manosa	+
Fenilalanina	-	Manitol	+
Movilidad	-	Melibiosas	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	-
Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	-	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	+
Bilis-Esculina	-	Trehalosa	+
Nitratos	+	Xilosa	-
Gelatina	-	$\beta$ -Glucoronidasa	N/E
Voges-Proskauer	-		

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento final			
<i>Shigella boydii</i>			
Gram	-	Arabinosa	+
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	-	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	+
Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	-	Manosa	+50
Fenilalanina	-	Manitol	+
Movilidad	-	Melibiosas	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	-
Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	+	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	-	Trehalosa	-
Nitratos	+	Xilosa	-
Gelatina	-	$\beta$ -Glucoronidasa	N/E
Voges-Proskauer	-		

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; N/E: prueba no ensayada; +50: fermentación lenta.

Los resultados de las pruebas realizadas para *Shigella boydii*, mostraron que fermenta de una forma lenta la Manosa, y dejó de producir ácido a partir de sorbitol y Trehalosa.

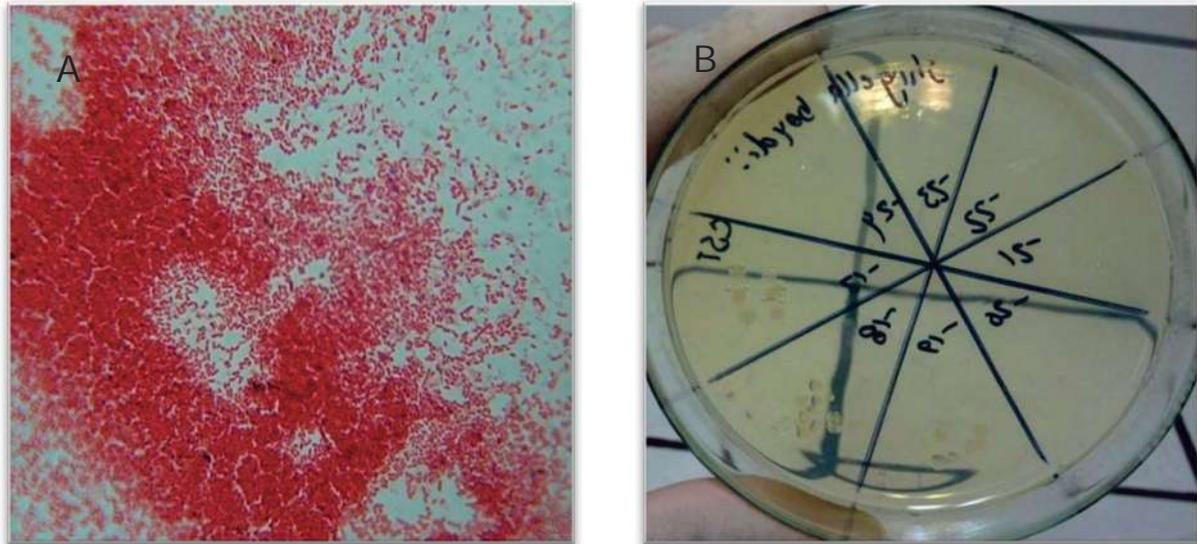


Figura 8. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Shigella boydii*  
A. Tinción gram de *Shigella boydii*; B. Viabilidad de *Shigella boydii* después de ocho meses de conservación.

---

### 7.4.3 Género Protea (Providencia)

La tribu Protea consta de 3 géneros, que son: *Proteus*, *Morganella* y *Providencia* las cuales son bioquímicamente similares.

El género *Providencia* reconoce actualmente 5 especies de *Providencia*: *P. stuartii*, *P. alcalifaciens*, *P. rettgeri* y las especies recién descritas *P. rustiganii* y *P. heimbachae*. Todas las especies del género *Providencia* desaminan la Fenilalanina, pero solo *P. rettgeri* hidroliza siempre la urea.

Salvo por producir infecciones de vías urinarias, para las cuales *Pender* ha citado varios brotes hospitalarios, las infecciones por especies de *Providencia* son infrecuentes y están limitadas a comunicaciones de casos esporádicos. Sin embargo sólo *P. alcalifaciens* puede asociarse con enfermedad diarreica, habitualmente en niños.

Particularmente para este ensayo se utilizaron dos cepas del género protea que son *P. rettgeri* y *P. stuartii* los cuales fueron conservados durante ocho meses por el método de tierra preparada estéril, midiendo la viabilidad bimestralmente, así como sus características fenotípicas las cuales se describen a continuación.

#### 7.4.3.1 *Providencia rettgeri*

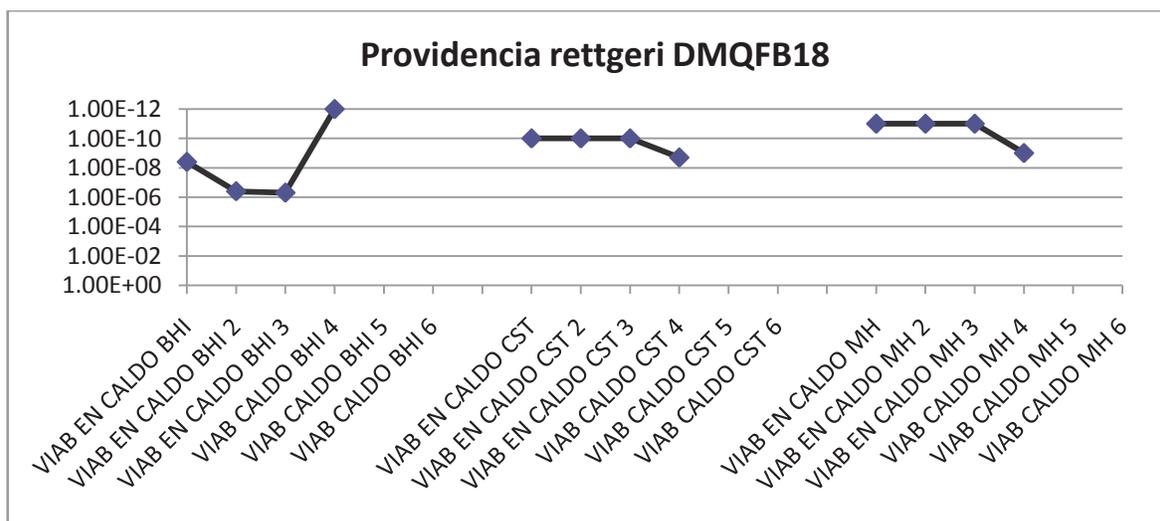


Figura 9: Gráfico de viabilidad de *Providencia rettgeri*

Los resultados obtenidos bimestralmente por este microorganismo conservado durante 8 meses fueron los siguientes:

Caldo BHI:  $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-12}$

Caldo ST:  $10^{-10}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$

Caldo M-H:  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$

Podemos observar que durante el periodo de conservación de *P. rettgeri* se obtuvo una viabilidad de entre  $10^{-6}$  y  $10^{-12}$  que se mantiene estable pero siendo variable la recuperación en caldo BHI con un despuente final en la viabilidad 4.

Estas cepas entéricas son fáciles de conservar en medios convencionales y este no es la excepción ya que se ha mantenido con buena viabilidad y con buenos resultados de las pruebas de metabolismo.

Tabla 8. Pruebas bioquímicas de *Providencia rettgeri*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS				PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial				Experimento final			
<i>Providencia rettgeri</i>				<i>Providencia rettgeri</i>			
Gram	-	Arabinosa	-	Gram	-	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-	Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+	Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	+	Lactosa	-	Galactosa	+
Glucosa	+	Glicerol	+	Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	+	Gas	-	Inositol	+
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+	Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	-	Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	+	Manosa	+	Citrato	+	Manosa	+
Fenilalanina	+	Manitol	+	Fenilalanina	+	Manitol	+
Movilidad	+	Melibiosa	-	Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	+	Myo-Inositol	+	Indol	+	Myo-Inositol	+
Ornitina	-	Rafinosa	-	Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	+	Ramnosa	+	Malonato	-	Ramnosa	+50
Rojo de metilo	+	Ribosa	+	Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	+	Sacarosa	-	Ureasa	+	Sacarosa	-
Arginina	-	Salicina	+	Arginina	-	Salicina	+
Almidón	N/E	Sorbitol	-	Almidón	N/E	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	+	Trehalosa	-	Bilis-Esculina	+	Trehalosa	-
Nitratos	+	Xilosa	-	Nitratos	+	Xilosa	-
Gelatina	-	$\beta$ -Glucuronidasa	N/E	Gelatina	-	$\beta$ -Glucuronidasa	N/E
Voges-Proskauer	-			Voges-Proskauer	-		

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; N/E: prueba no ensayada; +50: fermentación lenta.

La variabilidad metabólica de este microorganismo al final del ensayo resulto con solo una pequeña variación en la producción de ácido a partir de la Ramnosa al fermentarla de una manera lenta.

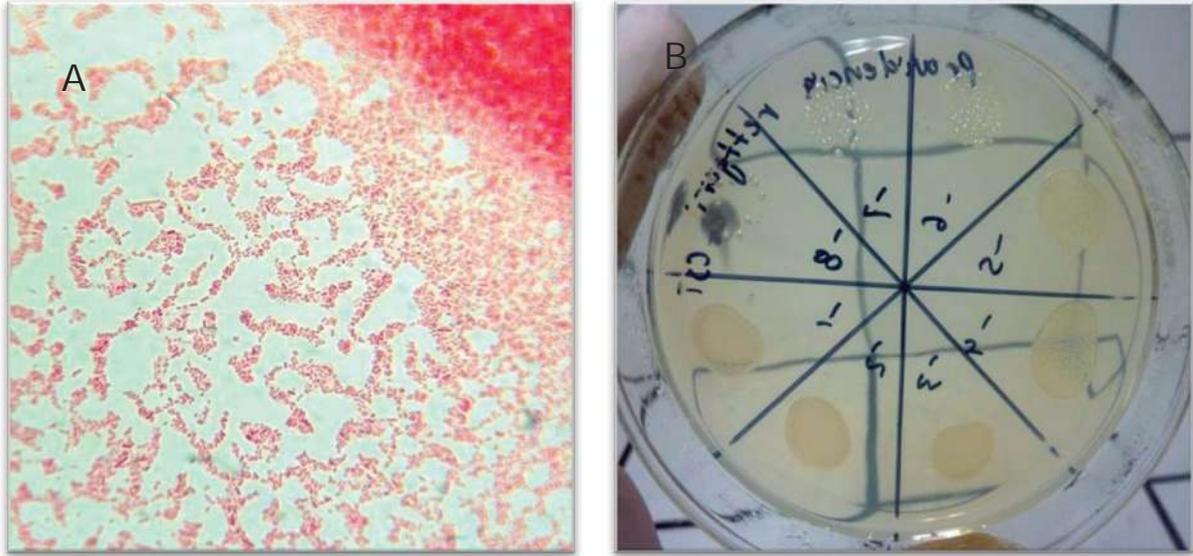


Figura 10. Análisis de la morfología macro y microscópica para *Providencia rettgeri*  
A. Tinción gram de *Providencia rettgeri*; B. Viabilidad de *Providencia rettgeri* después de ocho meses de conservación.

---

### 7.4.3.2 *Providencia stuartii*

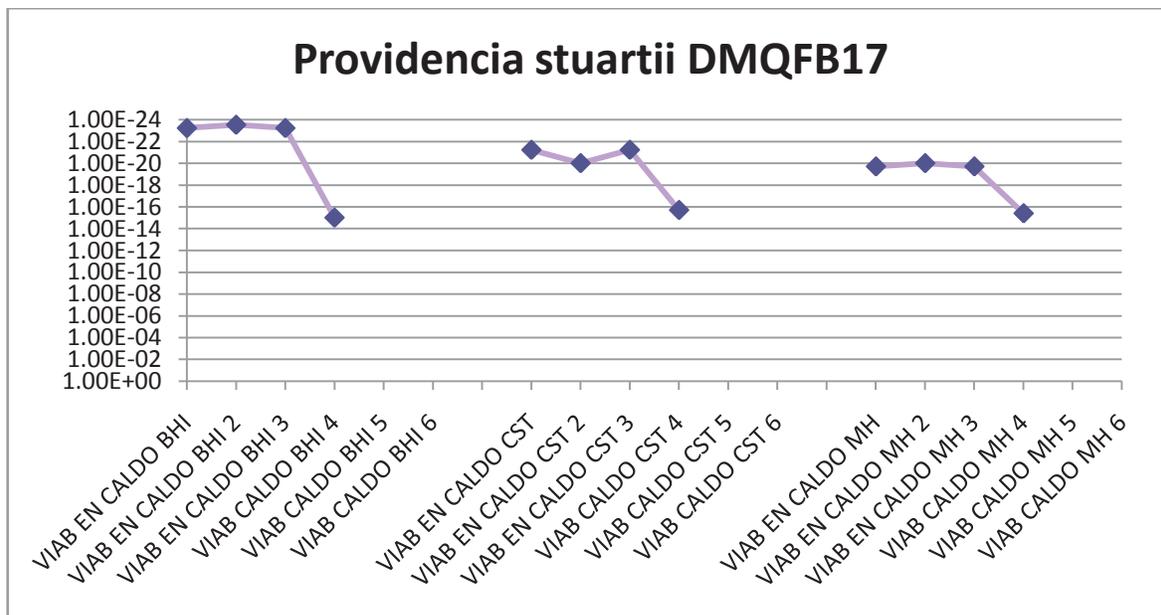


Figura 11. Gráfico de viabilidad de *Providencia stuartii*

Los resultados de la conservación de para este microorganismo muestra los siguientes resultados en los caldos de recuperación:

Caldo BHI:  $10^{-23}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-15}$

Caldo ST:  $10^{-21}$ ,  $10^{-20}$ ,  $10^{-22}$ ,  $10^{-16}$

Caldo M-H:  $10^{-20}$ ,  $10^{-20}$ ,  $10^{-20}$ ,  $10^{-16}$

Se conservo una cepa de *Providencia stuartii* durante un periodo de ocho meses de conservación, se observo que comenzó con un viabilidad cercana al 90% y al paso del tiempo descendió notablemente con todos los caldos de recuperación pero que aún mantiene viabilidades cercanas al 60% su estabilidad metabólica es buena.

Tabla 9. Pruebas bioquímicas de *Providencia stuartii*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS				PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial				Experimento final			
<i>Providencia stuartii</i>				<i>Providencia stuartii</i>			
Gram	-	Arabinosa	-	Gram	-	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-	Oxidasa	-	Dulcitol	+
Catalasa	+	Fructosa	+	Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	+	Lactosa	-	Galactosa	+
Glucosa	+	Glicerol	+	Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	-	Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+	Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	-	Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	+	Manosa	+	Citrato	+	Manosa	+
Fenilalanina	+	Manitol	-	Fenilalanina	+	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosa	-	Movilidad	+	Melibiosa	+
Indol	+	Myo-Inositol	+	Indol	+	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-	Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	+	Malonato	-	Ramnosa	+
Rojo de metilo	+	Ribosa	+	Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	+	Sacarosa	-	Ureasa	+	Sacarosa	-
Arginina	-	Salicina	-	Arginina	-	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	-	Almidón	N/E	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	-	Trehalosa	+	Bilis-Esculina	-	Trehalosa	+
Nitratos	+	Xilosa	-	Nitratos	+	Xilosa	-
Gelatina	-	$\beta$ -Glucuronidasa	N/E	Gelatina	-	$\beta$ -Glucuronidasa	N/E
Voges-Proskauer	-			Voges-Proskauer	-		

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; N/E: prueba no ensayada.

En los resultados bioquímicos obtenidos por esta cepa se observa que adquirió la capacidad de producir ácido a partir de Melibiosa y Dulcitol, pero no perdió ninguna de las características que poseía antes de la conservación.

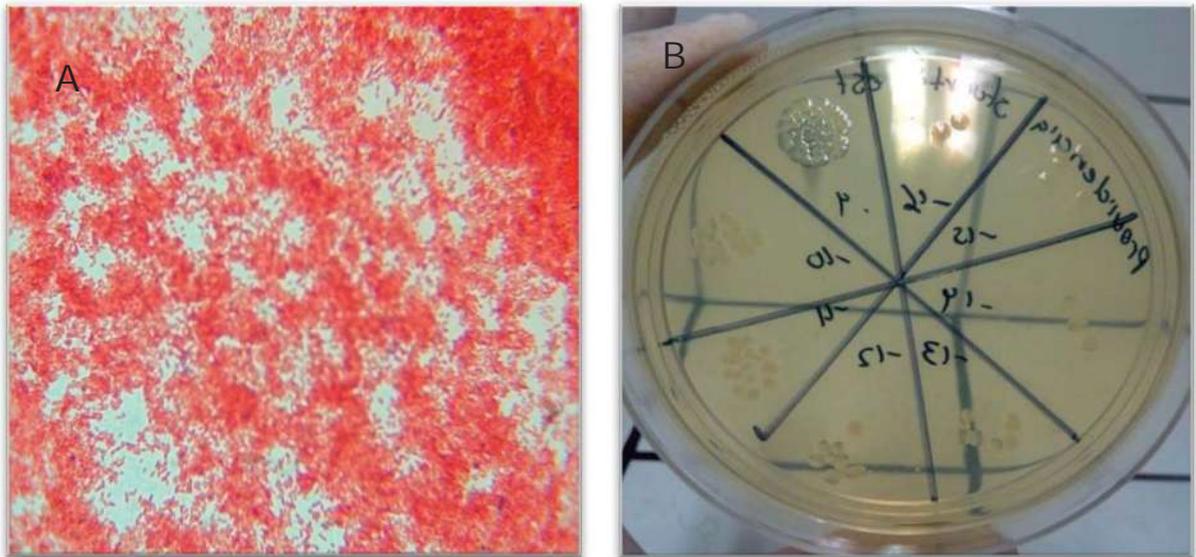


Figura 12. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Providencia stuartii*  
A. Tinción gram de *Providencia stuartii*; B. Viabilidad de *Providencia stuartii* después de ocho meses de conservación.

#### 7.4.4 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28925

El género *Pseudomonas* y algunos estrechamente relacionados, muchos de los cuales se ubicaban antes en el género *Pseudomonas* constituyen un grupo que se denomina Pseudomonales. Los miembros de este grupo comparten características de ser bacilos gramnegativos rectos o ligeramente curvos que son aerobios estrictos.

La mayoría de las cepas son móviles por medio de uno o más flagelos polares, utilizan la glucosa y otros hidratos de carbono en forma oxidativa y suelen ser citocromo oxidasa positivos. [Konneman & col., 2006]

Clínicamente *Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo que representa un serio problema de salud pública ya que es el agente causal de todo tipo de infecciones graves como meningitis, bacteremia, neumonía, endocarditis, infecciones de vías urinarias, así como infecciones nosocomiales, *Pseudomonas aeruginosa* presenta una resistencia intrínseca a todo tipo de antibióticos incluyendo los más modernos. [Batlle C., 2005]

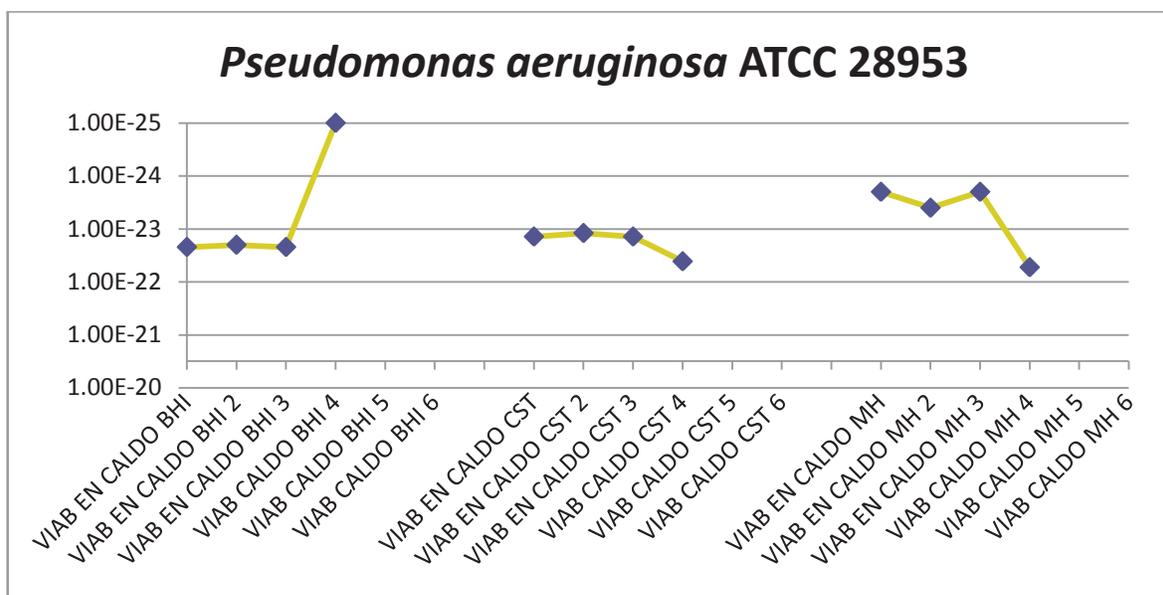


Figura 13. Gráfico de viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa*

Los resultados observados en el gráfico para este microorganismo en los caldos de recuperación son los siguientes.

Caldo BHI:  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-25}$

Caldo ST:  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-22}$

Caldo M-H:  $10^{-24}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-22}$

Se conservó una cepa de reserva de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28953 la cual mantiene sus características de referencia y fue conservada en suelo preparado estéril, durante un periodo de ocho meses a temperatura ambiente, desde el inicio del ensayo se mantuvo con viabilidades muy altas las cuales a través del tiempo se mantuvo en un rango de 90 a 100%, con excelente recuperación en todos los caldos disponibles. Se puede observar que el caldo BHI tiende a elevar la viabilidad la cual sobre pasa la escala del ensayo debido al número de colonias formadas en la última dilución, por otro lado con los caldos MH y CST van a la baja.

*Pseudomonas aeruginosa* es una cepa que puede ser inocua de tierra encontrada en diferentes tipos de suelos y es así que podemos afirmar que utilizando sus características inocuas puede mantener preservarse en suelo manteniendo sus características fenotípicas intactas.

Tabla 10. Pruebas bioquímicas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28953

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 28953			
Gram	-	Arabinosa	-
Oxidasa	+	Dulcitol	-
Catalasa	-	Fructosa	-
Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	-	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	-
Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	+	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	+	Ramnosa	-
Rojo de metilo	-	Ribosa	-
Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	+	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	-	Trehalosa	-
Nitratos	+	Xilosa	-
Gelatina	+	Pigmento	+
Voges-Proskauer	N/E	OF Glucosa	+

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento final			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 28953			
Gram	-	Arabinosa	-
Oxidasa	+	Dulcitol	-
Catalasa	-	Fructosa	-
Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	-	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	-
Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	+	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	+	Ramnosa	-
Rojo de metilo	-	Ribosa	-
Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	+	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	-	Trehalosa	-
Nitratos	+	Xilosa	-
Gelatina	+	Pigmento	+
Voges-Proskauer	N/E	OF Glucosa	+

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; N/E: prueba no ensayada.

Los resultados de la conservación de esta cepa de *Pseudomonas aeruginosa* no mostraron cambios en su metabolismo bioquímico después de los 8 meses que fue monitoreada.

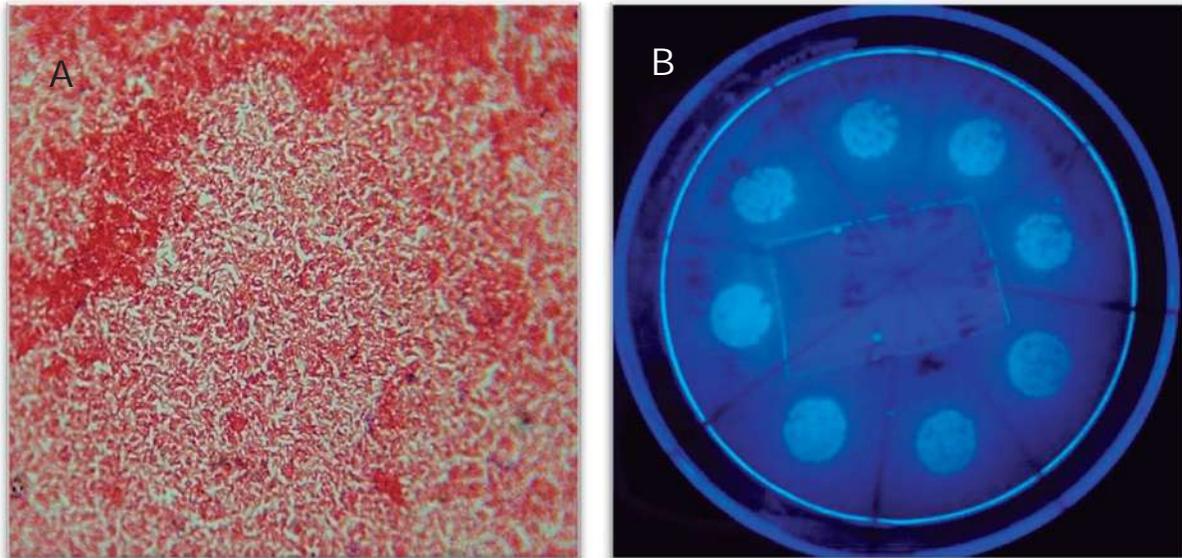


Figura 14. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28953  
A. Tinción gram de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28953; B. Viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28953 después de ocho meses de conservación.

---

### 7.4.5 *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria* consiste en bacteria con forma de bacilos regulares, grampositivas, no esporuladas, aerobias facultativas. El género está definido por un contenido en el DNA de G+C del 36-38%, una pared celular típica de grampositivos con una capa de mureína de peptidoglucano, que contiene ácido meso-diaminopimelico, fijada a la membrana celular por ácido lipoteicoico y ácidos teicoicos polirribitol asociados con la membrana.

Durante muchos años, el género *Listeria* consistió en ocho especies: *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. murray*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. denitrificans*. Sobre la base de la secuenciación del rRNA 16S de *L. denitrificans*, este microorganismo ha sido excluido del género *Listeria* y colocado en el género *Jonesia* de acuerdo al manual de Bergey.

Aun que todas las especies de *Listeria* pueden ser aisladas de en el medio ambiente y en diversos animales como patógenos y como comensales, solo *Listeria monocytogenes* es un patógeno animal y humano bien conocido.

*Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo capaz de invadir y sobrevivir dentro de las células de los mamíferos, incluidos los macrófagos y varias líneas celulares de cultivo tisular humano. [Konneman & col., 2006]

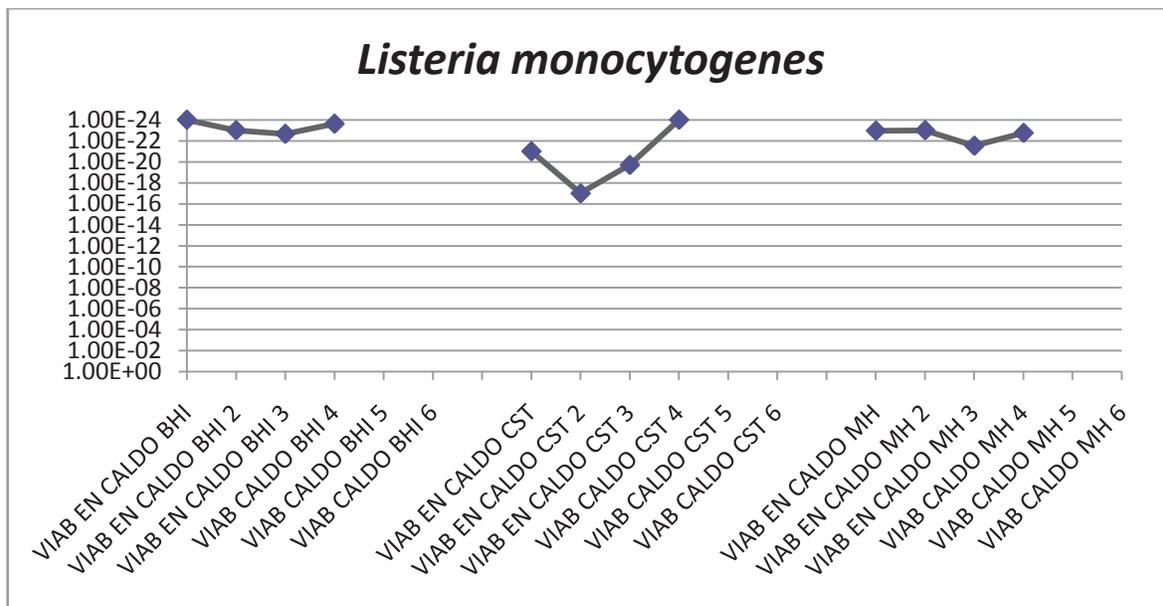


Figura 15. Gráfico de viabilidad de *Listeria monocytogenes*

Las viabilidades obtenidas por este microorganismo en los caldos de recuperación son los siguientes:

Caldo BHI:  $10^{-24}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-24}$

Caldo ST:  $10^{-21}$ ,  $10^{-17}$ ,  $10^{-20}$ ,  $10^{-24}$

Caldo M-H:  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-21}$ ,  $10^{-23}$

Esta cepa de *Listeria monocytogenes* de origen clínico aislada de una meningitis bacteriana, fue conservada en tierra preparada estéril, durante un periodo de 8 meses, la cual aprovechando sus características de género y como tal inocuo de suelo, mantuvo viabilidades de entre  $10^{-16}$  y  $10^{-24}$  las cuales se mantuvieron en un rango estable con todos los caldos de recuperación disponibles así como bioquímicamente mantuvo estables sus características fenotípicas.

Tabla 11. Pruebas bioquímicas de *Listeria monocytogenes*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS				PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial				Experimento final			
<i>Listeria monocytogenes</i>				<i>Listeria monocytogenes</i>			
Gram	+	Arabinosa	-	Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-	Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+	Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-	Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	-	Glucosa	+	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-	Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+	Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	+	Lisina	-	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	-	Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-	Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosa	-	Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-	Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-	Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	+	Malonato	-	Ramnosa	+
Rojo de metilo	+	Ribosa	-	Rojo de metilo	+	Ribosa	-
Ureasa	-	Sacarosa	-	Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	+	Salicina	-	Arginina	+	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	-	Almidón	N/E	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	+	Trehalosa	+	Bilis-Esculina	+	Trehalosa	+
Nitratos	-	Xilosa	-	Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	CAMP con <i>S. aureus</i>	+	Gelatina	+	CAMP con <i>S. aureus</i>	+
Voges-Proskauer	+	Tinción de esporas	-	Voges-Proskauer	+	Tinción de esporas	-

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; N/E: prueba no ensayada.

La cepa de *Listeria monocytogenes* no tuvo variaciones metabólicas después del periodo de conservación por el método de suelo preparado estéril.

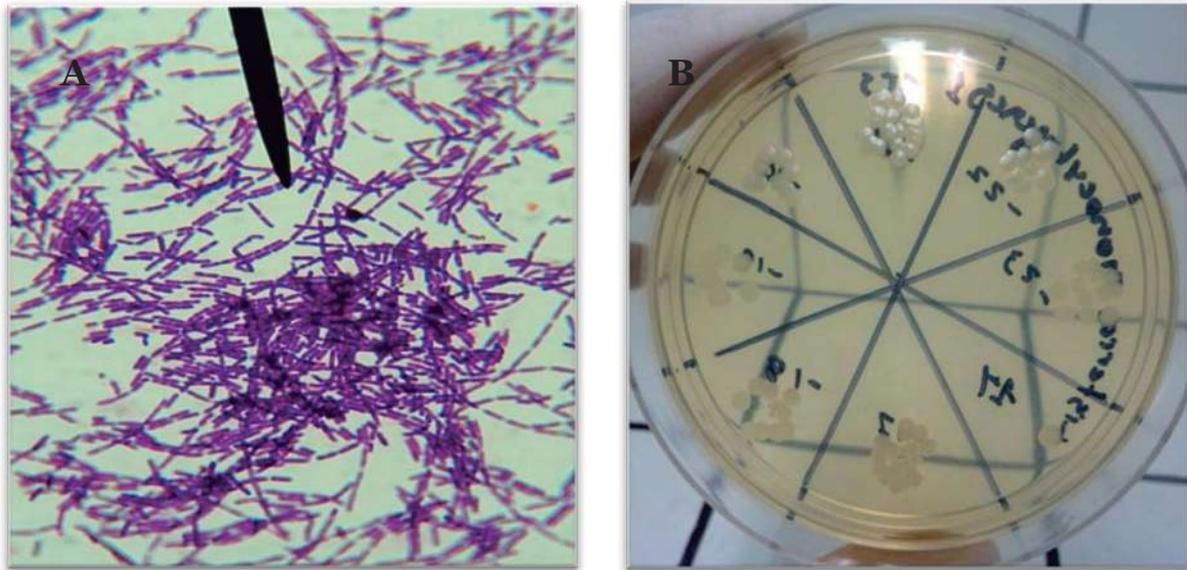


Figura 16. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Listeria monocytogenes*  
A. Tinción gram de *Listeria monocytogenes*; B. Viabilidad de *Listeria monocytogenes* después de ocho meses de conservación.

## 7.5 CEPAS DE IMPORTANCIA EN ALIMENTOS

Los alimentos juegan un papel importante en la trasmisión de enfermedades de origen alimentario debido a que se pueden contaminar a partir del aire, agua, suelo, animales, utensilios, el hombre y durante el proceso de producción primaria, transporte, almacenamiento, elaboración y distribución. [Vázquez G. 2003]

### 7.5.1 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza. La Listeriosis se considera una zoonosis, aunque la mayoría de las infecciones se producen en forma indirecta por contaminación de productos animales o vegetales ingeridos sin un procesamiento que permita eliminar el agente.

Aunque en 1953 se reconoció la participación de un alimento en la transmisión de la enfermedad, el primer brote de Listeriosis relacionado a alimentos fue comunicado en 1983. La investigación de este brote, detectado con relación a un aumento de casos perinatales, demostró que el causante fue repollo contaminado con deposiciones de ovejas infectadas. A partir de ese momento, *L. monocytogenes* se ha convertido en una más de las enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos.

Nuestro país no ha estado alejado de esta realidad y aunque la vigilancia de este agente infeccioso no se realiza en alimentos para consumo interno, sí se han hecho estudios que muestran su presencia en helados, quesos blandos, cecinas, mariscos y otros productos del campo. [Noriega M. 2008].

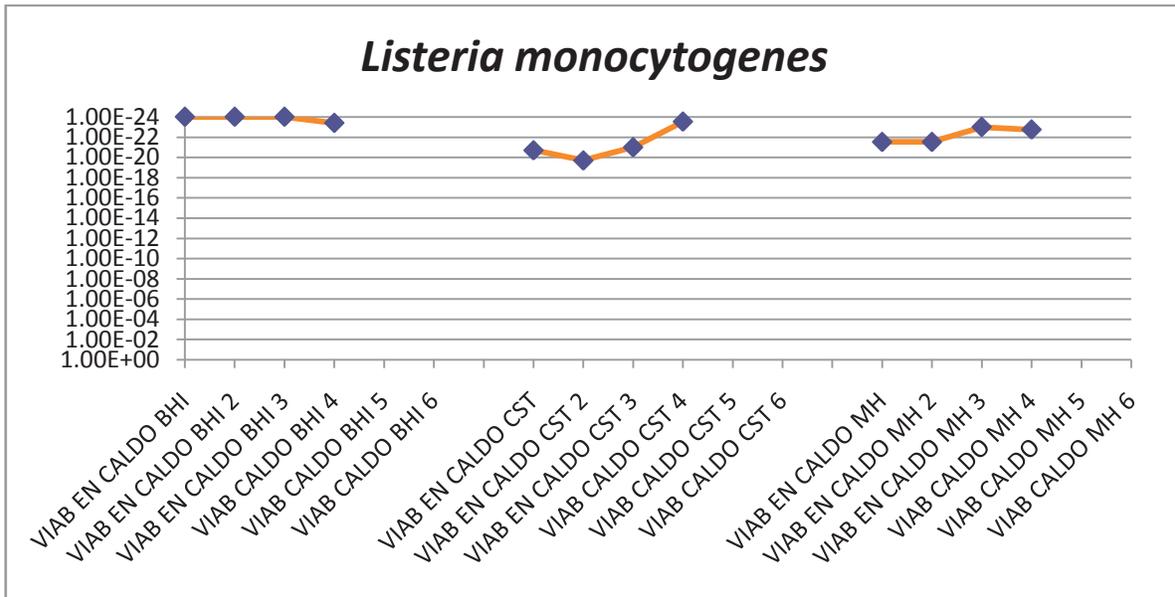


Figura 17. Gráfico de viabilidad de *Listeria monocytogenes*

Los resultados obtenidos por la cepa de *Listeria monocytogenes* de origen alimentario obtuvo los siguientes resultados para los tres caldos de recuperación de este experimento:

Caldo BHI:  $10^{-24}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-23}$

Caldo ST:  $10^{-21}$ ,  $10^{-20}$ ,  $10^{-21}$ ,  $10^{-24}$

Caldo M-H:  $10^{-22}$ ,  $10^{-22}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$

Continuando con el género *Listeria* descrito en el apartado anterior, se aisló de rizósfera de aguacate en el estado de Michoacán, una cepa de *Listeria monocytogenes* la cual fue tipificada bioquímicamente en el laboratorio de microbiología de la facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Podemos observar en el gráfico que este aislado de tierra mantuvo entre el 90 y 100% la viabilidad ensayada en el laboratorio por el método de M. & M. (modificado) y que debido a su procedencia inocua de tierra mantuvo todas sus características fenotípicas y es casi seguro que habrá mantenido sus características genéticas.

Tabla 12. Pruebas bioquímicas de *Listeria monocytogenes*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial			
<i>Listeria monocytogenes</i>			
Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	-
Lisina	-	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiososa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	+
Rojo de metilo	+	Ribosa	-
Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	+	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	+	Trehalosa	+
Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	CAMP con S. aureus	+
Voges-Proskauer	+	Tinción de esporas	-

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento final			
<i>Listeria monocytogenes</i>			
Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	-
Lisina	-	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiososa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	+
Rojo de metilo	+	Ribosa	-
Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	+	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	+	Trehalosa	+
Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	CAMP con S. aureus	+
Voges-Proskauer	+	Tinción de esporas	-

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; N/E: prueba no ensayada.

Los resultados bioquímicos para esta cepa no mostraron cambios metabólicos.

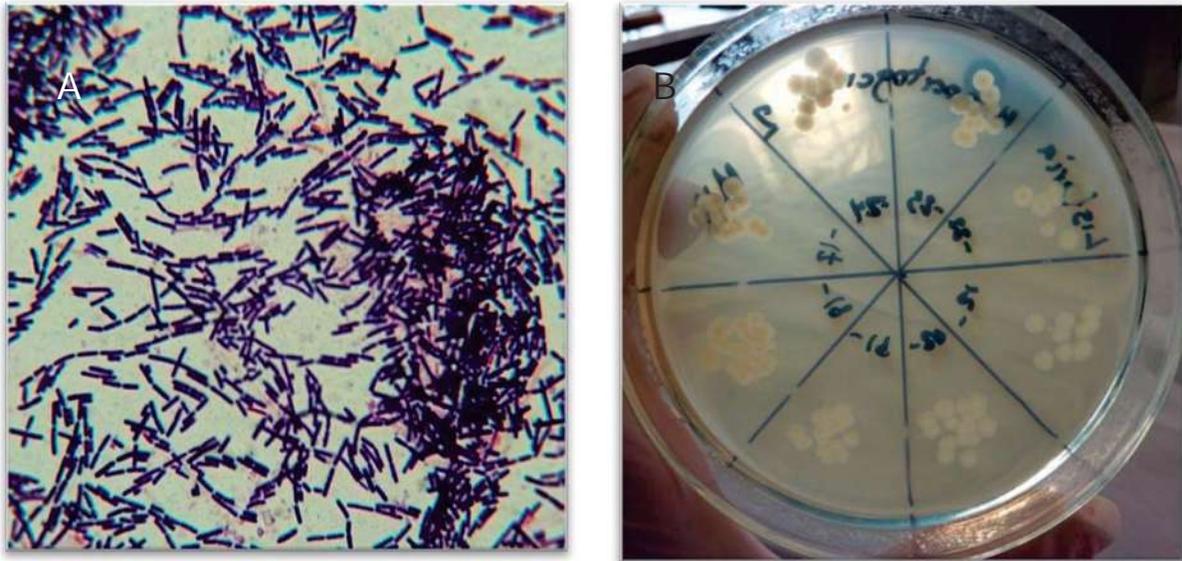


Figura 18. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Listeria Monocytogenes*  
A. Tinción gram de *Listeria monocytogenes*; B. Viabilidad de *Listeria monocytogenes* después de ocho meses de conservación.

### 7.5.2 *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* es un habitante común de los intestinos de todos los animales, incluyendo el hombre. Normalmente esta bacteria tiene la útil función en el cuerpo humano de suprimir el crecimiento de otras bacterias y contribuir a la síntesis de un apreciable volumen de vitaminas. Una minoría de cepas de *E. coli* son capaces de causar enfermedad humana a través de diferentes mecanismos.

Actualmente existen seis categorías principales de la bacteria *Escherichia coli* que produce gastroenteritis en el hombre. Entre ellas está *E. coli* enterohemorrágica, cuyo principal serotipo es el O157:H7. Se detectó por primera vez en el caso de intoxicación por hamburguesas de Estados Unidos en 1982.

La patogenicidad se asocia principalmente a la producción de citotoxinas llamadas verotoxinas. Este microorganismo es la causa principal de colitis hemorrágica, aunque otros serotipos de *E. coli* y *Shigella* spp. pueden producir citotoxinas semejantes y desencadenar la misma patología. Con predominancia en niños menores de 5 años, la infección puede ocasionar el síndrome urémico hemolítico (SHU). [Etelvina A. & col 2007]

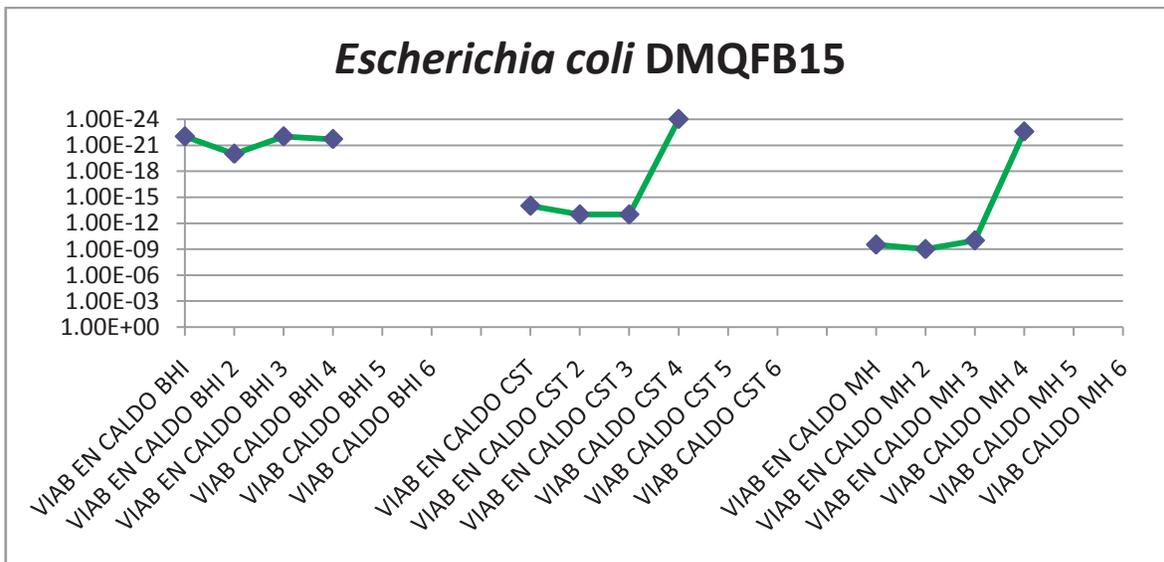


Figura 19. Gráfico de viabilidad de *Escherichia coli*

Los resultados bimestrales de la conservación de este microorganismo en tierra preparada estéril mostró las siguientes viabilidades:

Caldo BHI:  $10^{-22}$ ,  $10^{-20}$ ,  $10^{-22}$ ,  $10^{-22}$

Caldo ST:  $10^{-14}$ ,  $10^{-13}$ ,  $10^{-13}$ ,  $10^{-24}$

Caldo M-H:  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-24}$

Esta cepa de *Escherichia coli* fue aislada de una intoxicación alimentaria por vegetales mal desinfectados, la cual no se ha tipificado para saber si es toxigénica, pero dadas sus características morfológicas al gram es probable que sea algún serotipo toxigenico de *Escherichia coli*.

Esta cepa al ser inocua de suelos es mucho más viable en el método de tierra preparada estéril, en la cual obtuvo viabilidades de entre  $10^{-9}$  y  $10^{-24}$  sobre todo con la recuperación en el caldo BHI la cual mantuvo una viabilidad por arriba de  $10^{-18}$  a diferencia de los otros caldos cuya viabilidad fue menor pero que aun sobre pasa el  $10^{-9}$  y varia en los meses subsecuentes, pero manteniendo la mayoría de las características fenotípicas de *Escherichia coli*.

Tabla 13. Pruebas bioquímicas de *Escherichia coli*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial			
<i>Escherichia coli</i>			
Gram	-	Arabinosa	+
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	+	Galactosa	+
Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	+	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	+	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	+
Fenilalanina	-	Manitol	+
Movilidad	+	Melibiosas	+
Indol	+	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	+
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	-	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	+
Bilis-Esculina	-	Trehalosa	+
Nitratos	+	Xilosa	+
Gelatina	-	$\beta$ -Glucuronidasa	+
Voges-Proskauer	-		

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento final			
<i>Escherichia coli</i>			
Gram	-	Arabinosa	+
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	+	Galactosa	+
Glucosa	+	Glicerol	+50
Gas	+	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	+	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	+
Fenilalanina	-	Manitol	+
Movilidad	+	Melibiosas	+50
Indol	+	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	+
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	-	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	+
Bilis-Esculina	-	Trehalosa	+
Nitratos	+	Xilosa	+
Gelatina	-	$\beta$ -Glucuronidasa	+
Voges-Proskauer	-		

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; N/E: prueba no ensayada.

Los resultados de las pruebas de metabolismo bioquímico mostraron que para la cepa de *Escherichia coli* aislada de alimentos del campo, mostraron que en la producción de ácido a partir de hidratos de carbono, la Melibiosas y el Glicerol se fermentan de una manera lenta.

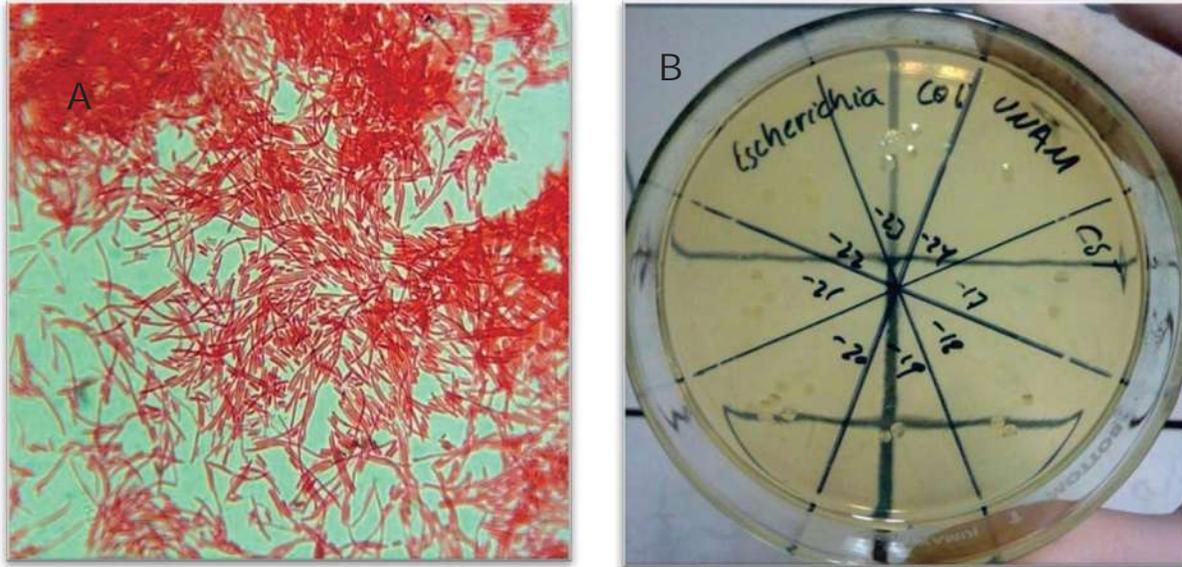


Figura 20. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Escherichia coli*  
A. Tinción gram de *Escherichia coli*; B. Viabilidad de *Escherichia coli* después de ocho meses de conservación.

### 7.5.3 *Bacillus cereus*

El papel de *Bacillus cereus* como causante de gastroenteritis se demostró por Hauge en Noruega en la década de los 50's del siglo XX. *B. cereus* elabora varios metabolitos extracelulares, que incluyen una enterotoxina diarreica y una emética, que se asocian a las dos formas de enfermedad transmitida por los alimentos (ETAs) que produce.

El incremento en la producción, comercialización y consumo de alimentos exige cada día un control más eficiente y estricto de su calidad higiénica sanitaria, con el fin de prevenir las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). *Bacillus cereus* es un microbio responsable de brotes de origen alimentario. Esta bacteria tiene una amplia distribución en el ambiente, lo que facilita su acceso a los alimentos en bajas concentraciones por lo que se consideran inocuos en la mayoría de las circunstancias.

En general la confirmación de brotes y casos esporádicos por *B. cereus*, asociados al consumo de alimentos, se dificulta en ocasiones por la amplia distribución de la bacteria en el ambiente que facilita su acceso a los alimentos en bajas concentraciones, por no realizarse estudios para la búsqueda intencional de este microorganismo en el alimento y dada su similitud con los síndromes que producen *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*. [Martino T. & col., 2010]

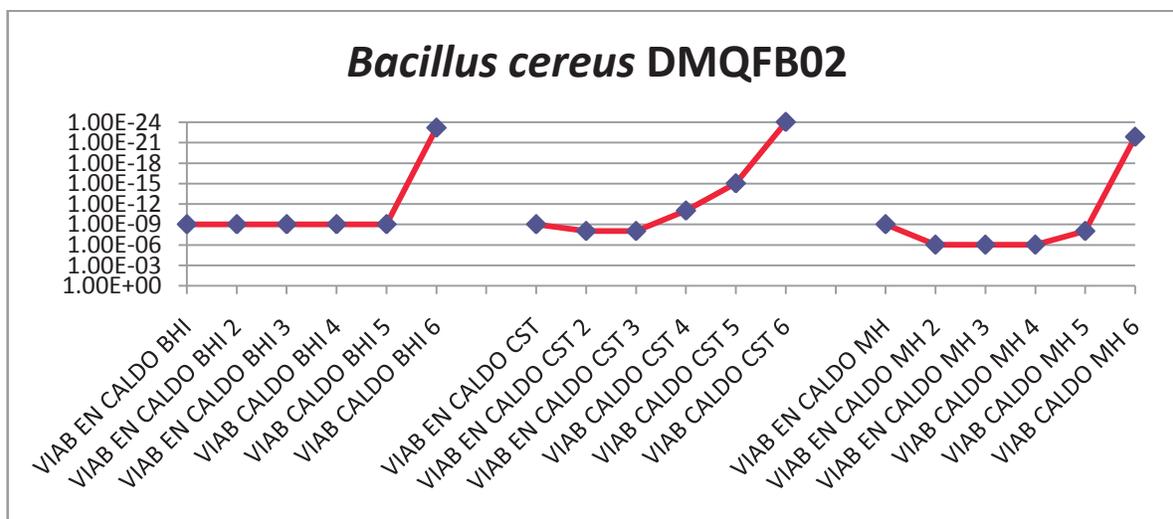


Figura 21. Gráfico de viabilidad de *Bacillus cereus*

Los resultados obtenidos de la viabilidad de esta cepa para los tres caldos de recuperación respectivamente son los siguientes:

Caldo BHI:  $10^{-9}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-23}$

Caldo ST:  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-24}$

Caldo M-H:  $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-21}$

Se sometió a conservación por el método de tierra preparada estéril, una cepa de *Bacillus cereus* durante un periodo de 12 meses, la cual mantuvo resultados variables, particularmente el caldo de recuperación BHI mantenía una viabilidad lineal y en el último ensayo se elevó súbitamente en aproximadamente  $10^{-12}$  debido a ajustes de estandarización en el método.

Para el caldo soya y el caldo Mueller-Hinton la viabilidad fue en aumento paulatino de aproximadamente  $10^{-3}$  cada bimestre de hasta alcanzar niveles cercanos a  $10^{-24}$ , manteniendo sus características metabólicas intactas ya que los bacilos esporulados tienden a ser muy resistentes al estrés metabólico.

Tabla 14. Pruebas bioquímicas de *Bacillus cereus*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS				PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial				Experimento final			
<i>Bacillus cereus</i>				<i>Bacillus cereus</i>			
Gram	+	Arabinosa	-	Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-	Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+	Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-	Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	+	Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	-	Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+	Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	+	Maltosa	+	Lisina	+	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	-	Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-	Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosa	-	Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-	Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-	Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-	Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+	Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	+	Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	+	Salicina	+	Arginina	+	Salicina	+
Almidón	+	Sorbitol	-	Almidón	+	Sorbitol	-
Caseína	+	Trehalosa	+	Caseína	+	Trehalosa	+
Nitratos	+	Xilosa	-	Nitratos	+	Xilosa	-
Gelatina	+	Tinción de Esporas	+	Gelatina	+	Tinción de Esporas	+
Voges-Proskauer	+	Bilis-Esculina	-	Voges-Proskauer	+	Bilis-Esculina	-

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa;

Las pruebas metabólicas realizadas para este microorganismo no mostraron cambios en el metabolismo de esta bacteria la cual se ha manteniendo estable después del lapso de conservación.

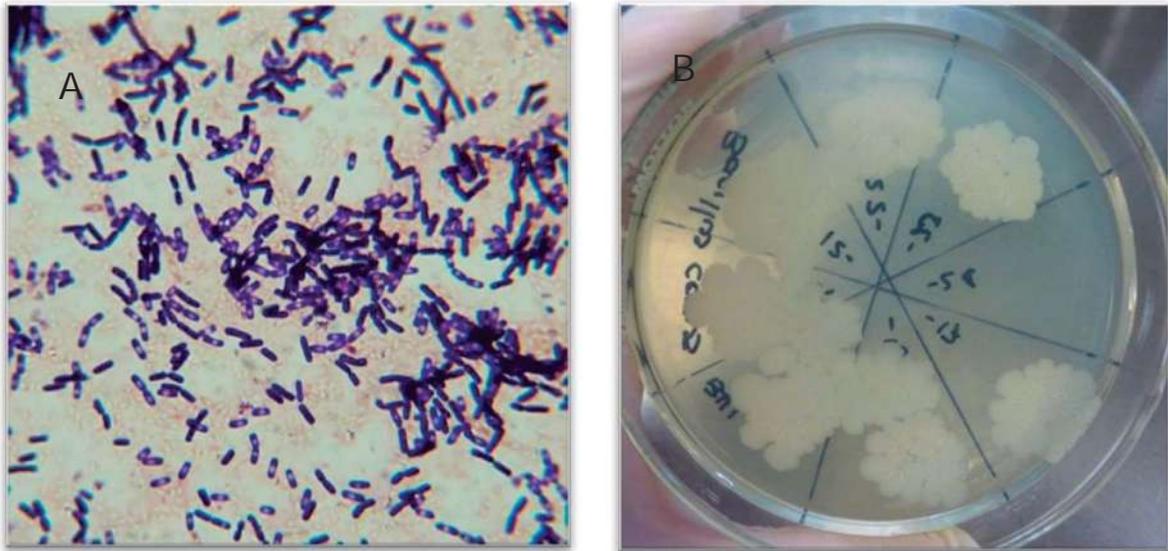


Figura 22. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Bacillus cereus*  
A. Tinción gram de *Bacillus cereus*; B. Viabilidad de *Bacillus cereus* después de doce meses de conservación.

---

#### 7.5.4 *Bacillus subtilis*

La naturaleza bien caracterizada del género *Bacillus* spp. ha tenido una vasta investigación, ya que como tal, es una bacteria aerobia facultativa, gram positiva en forma de bastón, formadora de esporas. Su morfología se ha caracterizado como esporas ovals con formación de paredes delgadas que no provocan deformaciones apreciables en las células vegetativas a partir de las cuales se desarrollan y su formación se lleva en la parte central o para central de la célula [Konneman & col., 2006].

Según González y Fragoso (1998), *Bacillus subtilis* es un microorganismos que no es potencialmente patógeno, no produce endotoxinas y se sabe que sintetiza proteínas que son secretadas al medio, algunas de las cuales se les ha encontrado propiedades antifúngicas como la subtilina.

*Bacillus subtilis* tiene la capacidad de producir ácidos a partir de algunos compuestos orgánicos como la glucosa, el manitol y la sacarosa. Por otro lado fermentan generalmente la caseína y puede producir la proteólisis de la leche condensada en productos lácteos.

Esta bacteria se ha encontrado en muchos alimentos, en la mayoría de los cuales puede causar modificaciones y provocar por tanto intoxicaciones al ser ingeridos. Sin embargo también se le han atribuido propiedades que aceleran la maduración y el desarrollo de aromas en ciertos alimentos como quesos manchegos [González y Fregoso 1998].

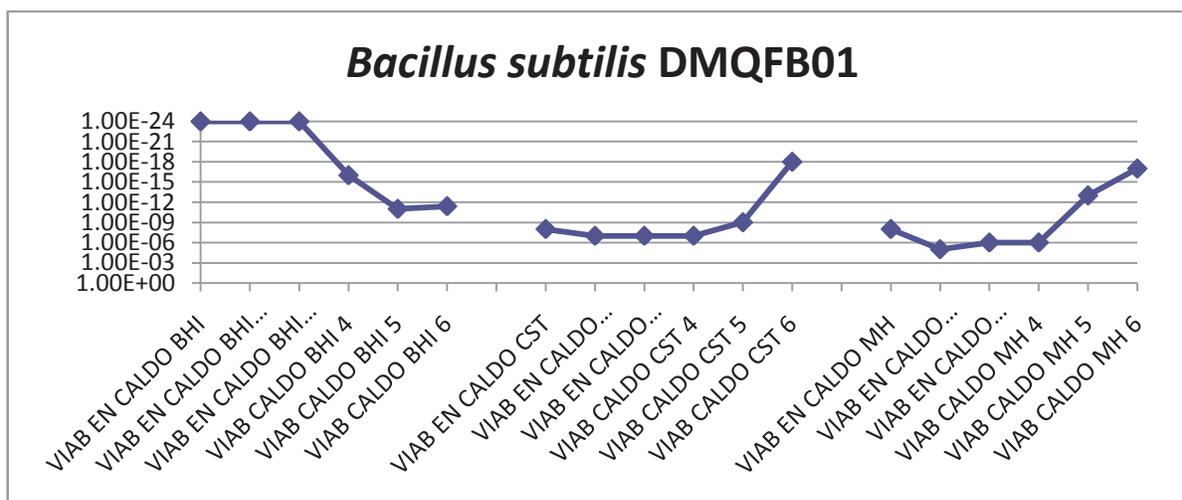


Figura 23. Gráfico de viabilidad de *Bacillus subtilis*

Los resultados obtenidos para esta cepa en los caldos de recuperación utilizados para este ensayo muestran lo siguiente:

Caldo BHI:  $10^{-24}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-17}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-12}$

Caldo ST:  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-18}$

Caldo M-H:  $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-18}$

La cepa de *Bacillus subtilis* conservada después de 12 meses en tierra preparada estéril, a temperatura ambiente, nos muestra que la bacteria decayó en la viabilidad cuando se utilizó el caldo de recuperación BHI, mas sin embargo, la cepa tuvo una elevación de un  $10^{-9}$  con los otros caldos de recuperación CST y MH, bioquímicamente se mantuvo estable gracias a que es una cepa inocua de suelo y además porque es una bacteria generadora de esporas y debemos tener en cuenta que estas son la forma más resistentes de vida y estas bacterias al ser sometidas a estrés bacteriano, para sobrevivir, tienden a sobre esporular.

Tabla 15. Pruebas bioquímicas de *Bacillus subtilis*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial			
<i>Bacillus subtilis</i>			
Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	+
Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	-	Salicina	+
Almidón	+	Sorbitol	-
Caseína	+	Trehalosa	+
Nitratos	+	Xilosa	-
Gelatina	+	Tinción de Esporas	+
Voges-Proskauer	+	Bilis-Esculina	-

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento final			
<i>Bacillus subtilis</i>			
Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	+
Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	-	Salicina	+
Almidón	+	Sorbitol	-
Caseína	+	Trehalosa	+
Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	Tinción de Esporas	+
Voges-Proskauer	+	Bilis-Esculina	-

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa.

Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas de este microorganismo no mostraron cambios en el metabolismo.

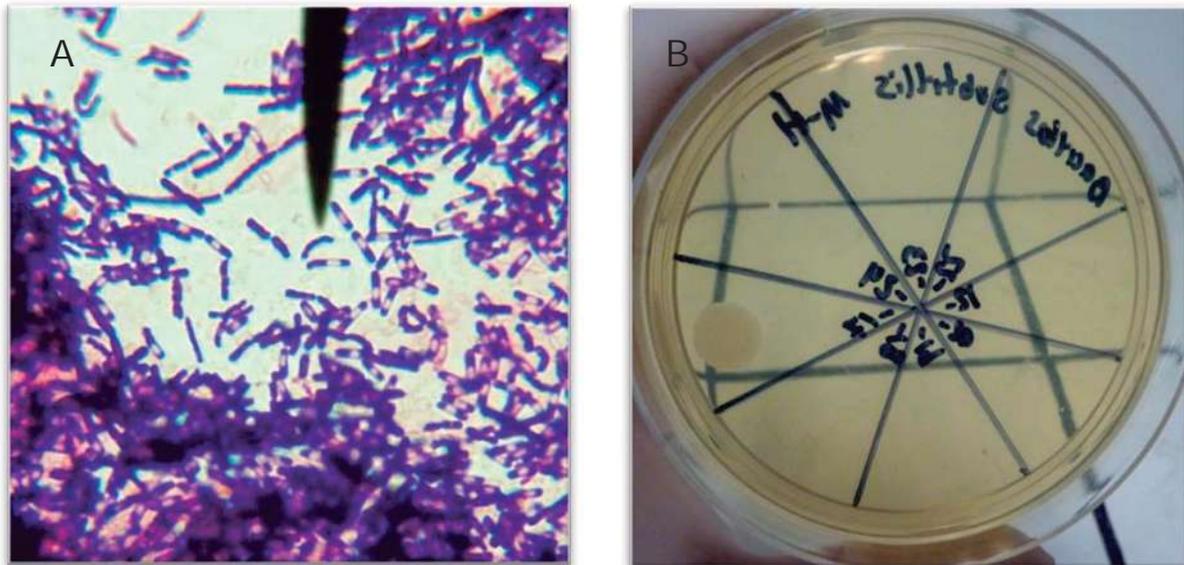


Figura 24. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Bacillus subtilis*  
A. Tinción gram de *Bacillus subtilis*; B. Viabilidad de *Bacillus subtilis* después de doce meses de conservación.

---

### 7.5.5. *Bacillus coagulans*

El *Bacillus coagulans* es una ubicua de suelo pero que en ocasiones puede contaminar alimentos ya que es una bacteria acidófila que crece en pH de hasta 4.2, es una bacteria que puede germinar en el intestino y su principal uso es como probiótico.

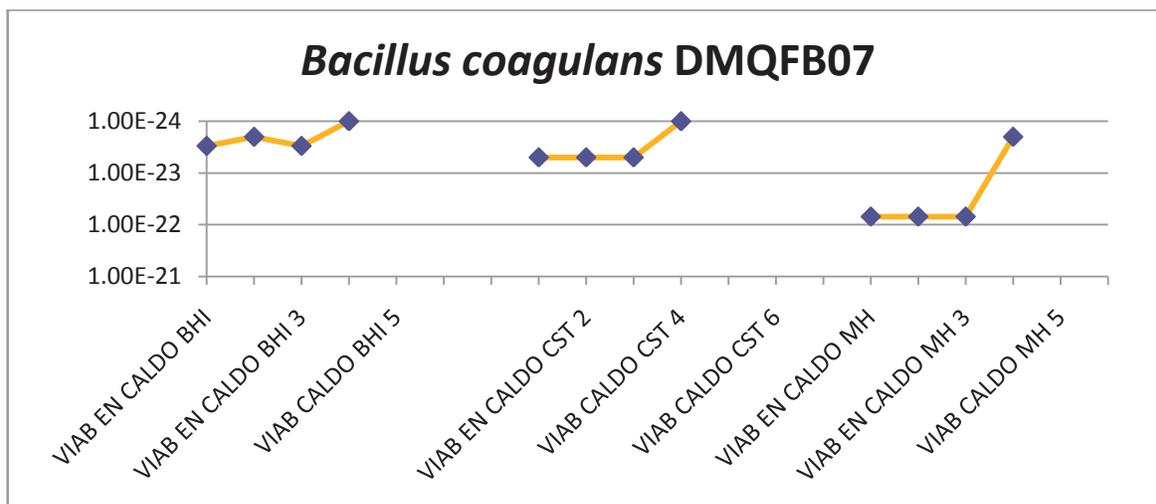


Figura 25. Gráfico de viabilidad de *Bacillus coagulans*

Los resultados obtenidos a partir de esta cepa en diferentes caldos de recuperación son:

Caldo BHI:  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-24}$

Caldo ST:  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-24}$

Caldo M-H:  $10^{-22}$ ,  $10^{-22}$ ,  $10^{-22}$ ,  $10^{-24}$

La cepa de *Bacillus coagulans* conservada durante un periodo de ocho meses, la cual fue aislada de una rizósfera de cacahuete en el estado de Guanajuato, manteniendo viabilidades de entre 98 y 100%, ya que las condiciones inocuas de la cepa le permiten subsistir en el estrés metabólico del suelo modificado estéril al que fue sometida. La cepa mantuvo las viabilidades constantes en los tres caldos de recuperación.

Tabla 16. Pruebas bioquímicas de *Bacillus coagulans*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS				PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial				Experimento final			
<i>Bacillus coagulans</i>				<i>Bacillus coagulans</i>			
Gram	+	Arabinosa	-	Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-	Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+	Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-	Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	+	Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	-	Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+	Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	+	Lisina	-	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	+	Citrato	-	Manosa	+
Fenilalanina	-	Manitol	+	Fenilalanina	-	Manitol	+
Movilidad	+	Melibiosa	-	Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-	Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-	Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-	Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+	Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	-	Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	-	Salicina	+	Arginina	-	Salicina	+
Almidón	+	Sorbitol	-	Almidón	+	Sorbitol	-
Caseína	-	Trehalosa	+	Caseína	-	Trehalosa	+
Nitratos	-	Xilosa	-	Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	-	Tinción de Esporas	+	Gelatina	-	Tinción de Esporas	+
Voges-Proskauer	-	Bilis-Esculina	-	Voges-Proskauer	-	Bilis-Esculina	-

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa.

Los resultados de las pruebas bioquímicas ensayadas para este microorganismo no mostraron cambios metabólicos después de la conservación

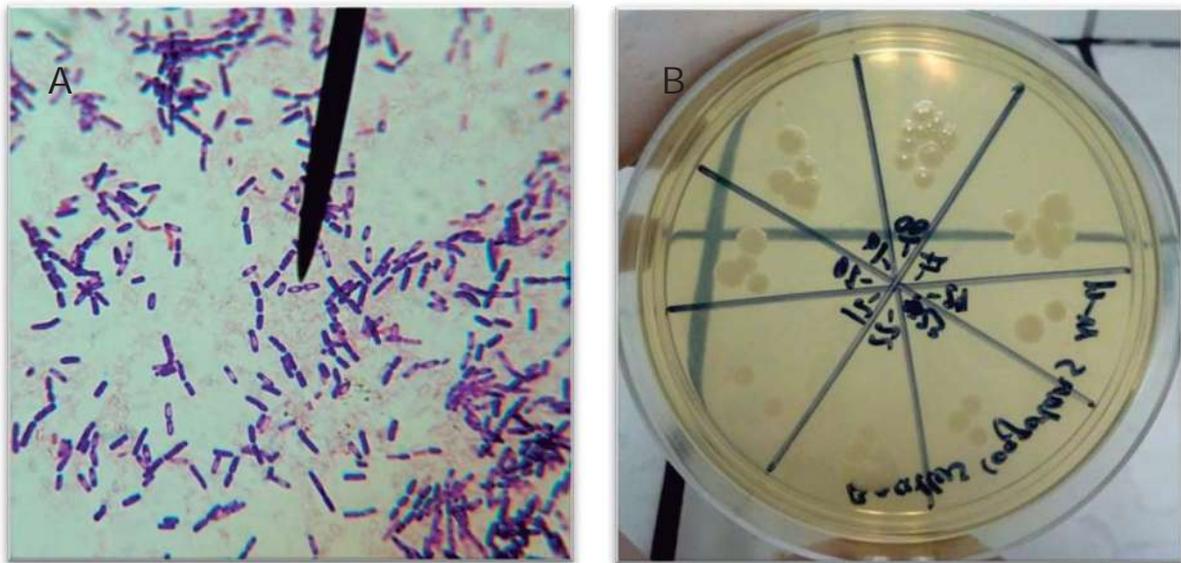


Figura 26. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Bacillus coagulans*

A. Tinción gram de *Bacillus coagulans*; B. Viabilidad de *Bacillus coagulans* después de ocho meses de conservación.

---

## 7.6 CEPAS DE IMPORTANCIA ECOLÓGICA

### 7.6.1 *Bacillus mycooides*

*Bacillus mycooides* es un organismo ubicuo del suelo común. El aislamiento de este microorganismo ha sido utilizado para su uso experimental como fungicida para el control de *Cercospora* en hojas de remolacha azucarera. No se ha presentado daño a los seres humanos o el medio ambiente.

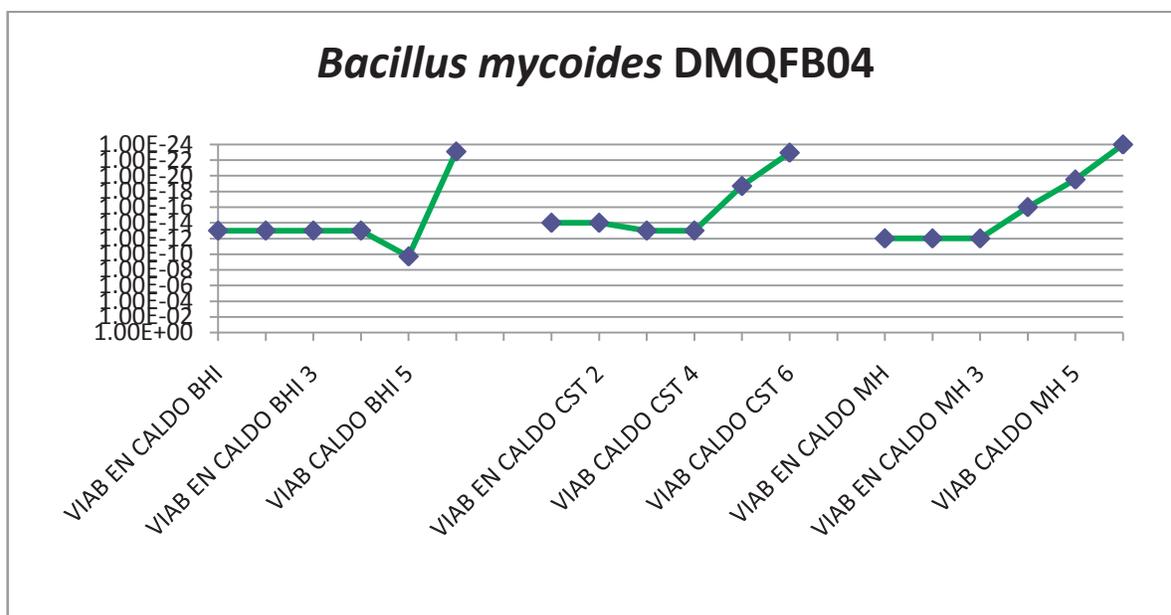


Figura 27. Gráfico de viabilidad de *Bacillus mycooides*

Se conservaron durante un periodo de seis meses, un aislado de *Bacillus mycooides* aislado de la rizósfera de maíz, las cuales tuvieron una viabilidad con aumento exponencial de aproximadamente un  $10^{-3}$  bimestralmente en el CST y MH, a diferencia del de caldo BHI que seguía una viabilidad lineal y con a un aumento de casi un  $10^{-12}$  en el último bimestre.

Tabla 17. Pruebas bioquímicas de *Bacillus mycoides*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS				PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial				Experimento final			
<i>Bacillus mycoides</i>				<i>Bacillus mycoides</i>			
Gram	+	Arabinosa	-	Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-	Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+	Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-	Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	-	Glicerol	+	Glucosa	-	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	-	Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+	Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+50
Lisina	-	Maltosa	+	Lisina	-	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	-	Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-	Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	-	Melibiosa	-	Movilidad	-	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-	Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-	Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-	Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+	Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	+	Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	-	Salicina	+	Arginina	-	Salicina	+
Almidón	+	Sorbitol	-	Almidón	+	Sorbitol	-
Caseína	+	Trehalosa	+	Caseína	+	Trehalosa	+
Nitratos	+	Xilosa	-	Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	Tinción de Esporas	+	Gelatina	+	Tinción de Esporas	+
Voges-Proskauer	+	Bilis-Esculina	-	Voges-Proskauer	+	Bilis-Esculina	-

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; +50 Fermentador lento.

Los resultados de las pruebas bioquímicas mostraron una variación en la producción de ácido a partir de la levulosa la cual la fermenta de una manera lenta después de la conservación.

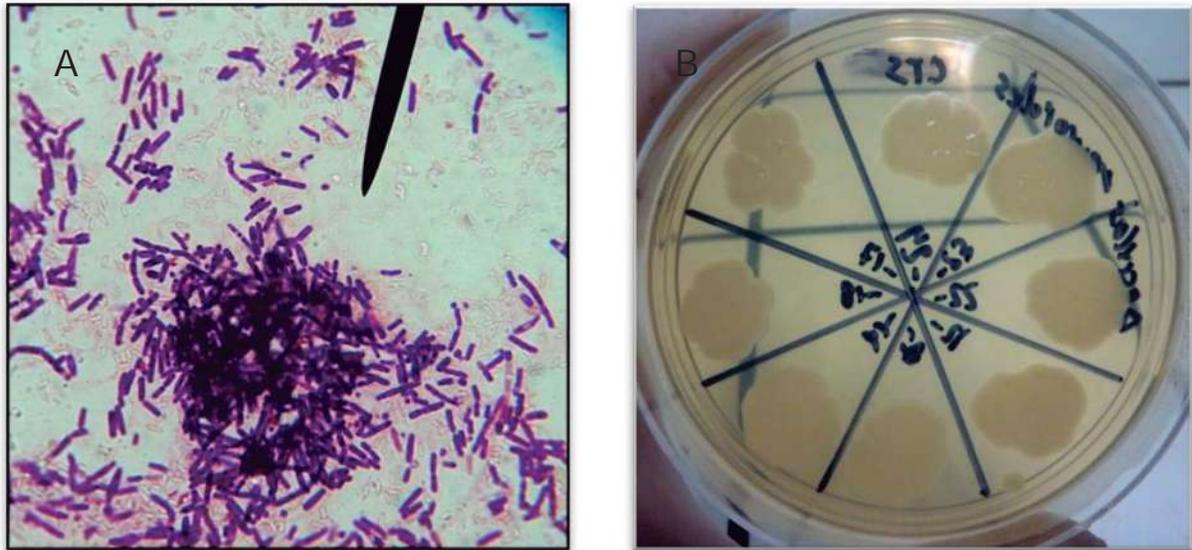


Figura 28. Análisis de la morfología macro y microscópica *Bacillus mycooides*

A. Tinción gram de *Bacillus mycooides*; B. Viabilidad de *Bacillus mycooides* después de ocho meses de conservación.

---

### 7.6.2 *Bacillus megaterium*

La importancia ecológica de la cepa de *Bacillus megaterium* radica en que un importante promotor del crecimiento vegetal, produciendo auxinas o compuestos similares a las auxinas y etileno. Se ha encontrado que las auxinas y el etileno reprimen el crecimiento de la raíz primaria de *arabidopsis thaliana*.

La producción de estos compuestos volátiles por parte de *Bacillus megaterium* favorece el crecimiento de las raíces secundaria, incrementando de de una manera exponencial hasta en un 200% la biomasa vegetal [López-Bucio & col 2002].

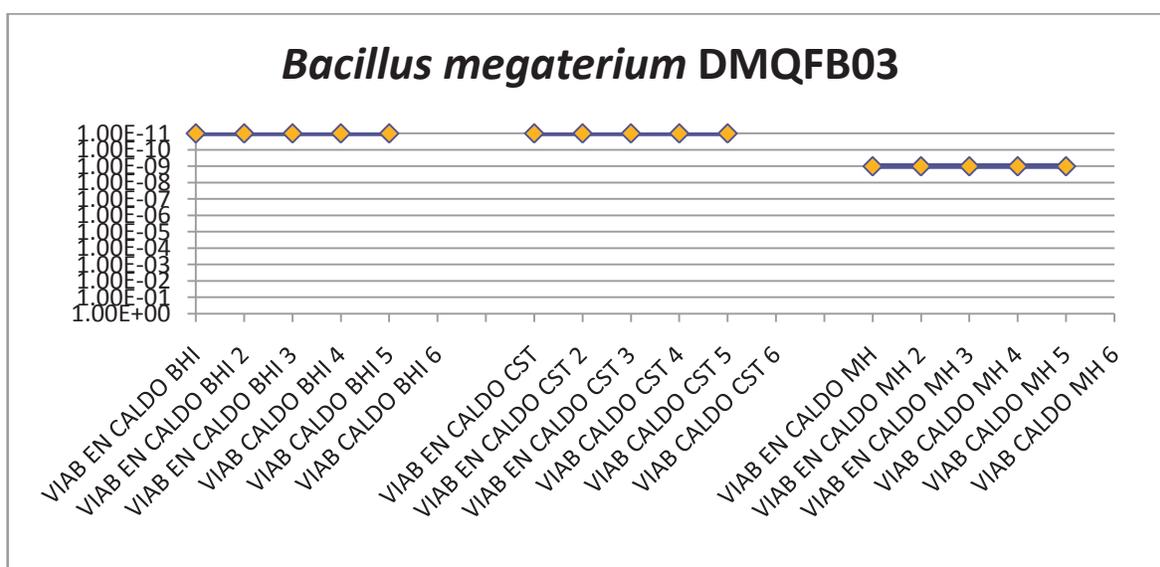


Figura 29. Gráfico de viabilidad de *Bacillus megaterium*

Los resultados obtenidos y graficados bimestralmente para este microorganismo para cada uno de los caldos de recuperación son los siguientes:

Caldo BHI:  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$

Caldo ST:  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$

Caldo M-H:  $10^{-9}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$

El comportamiento de la cepa de *Bacillus megaterium*, conservada durante un periodo de 8 meses por el método de tierra preparada estéril, obtuvo un resultado totalmente lineal con viabilidades bajas de entre  $10^{-9}$  y  $10^{-11}$ , en comparación de otros bacilos esporulados los cuales obtienen casi el doble de viabilidad.

Tabla 18. Pruebas bioquímicas de *Bacillus megaterium*

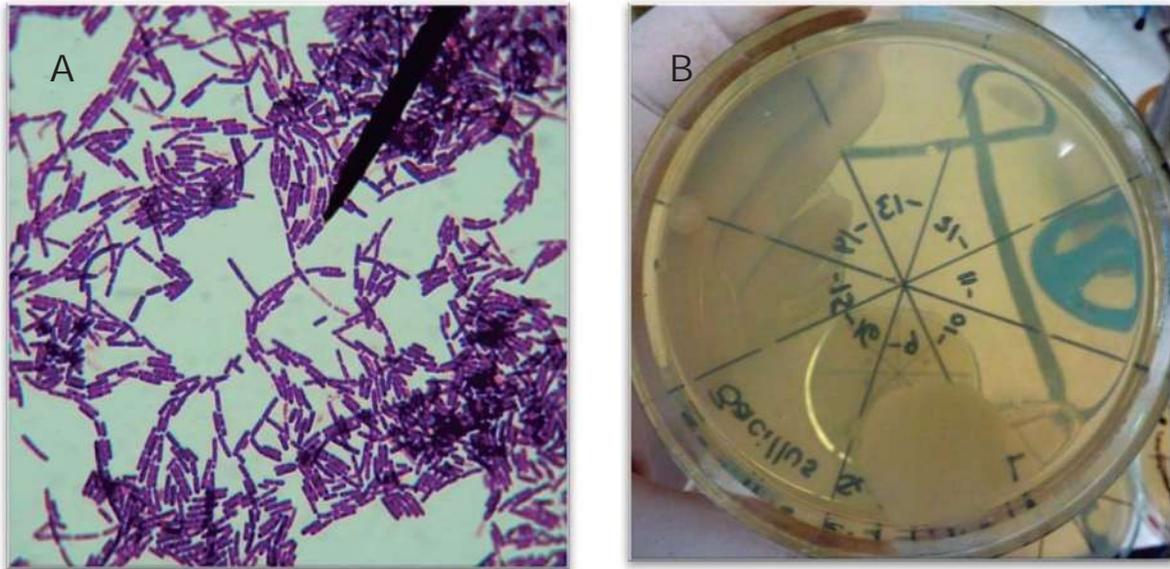
PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial			
<i>Bacillus megaterium</i>			
Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	+
Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	-	Salicina	+
Almidón	+	Sorbitol	-
Caseína	+	Trehalosa	+
Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	Tinción de Esporas	+
Voges-Proskauer	-	Bilis-Esculina	-

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento final			
<i>Bacillus megaterium</i>			
Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	+
Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	-	Salicina	+
Almidón	+	Sorbitol	-
Caseína	+	Trehalosa	+
Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	Tinción de Esporas	+
Voges-Proskauer	-	Bilis-Esculina	-

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa.

Las pruebas bioquímicas ensayadas para este microorganismo no muestran cambios de metabolismo después de la conservación.

---



**Figura 30. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Bacillus megaterium***  
**A. Tinción gram de *Bacillus megaterium*; B. Viabilidad de *Bacillus megaterium* después de ocho meses de conservación.**

---

### 7.6.3 *Bacillus badius*

El *Bacillus badius* es un microorganismo ubicuo de tierra que se ha aislado en las heces de muchas aves y mamíferos así como del polvo, alimentos y algunos fármacos como antiácidos; pero principalmente los estudios realizados sobre esta bacteria son en aislados de fuentes marinas. No se ha descrito como patógeno en humanos.

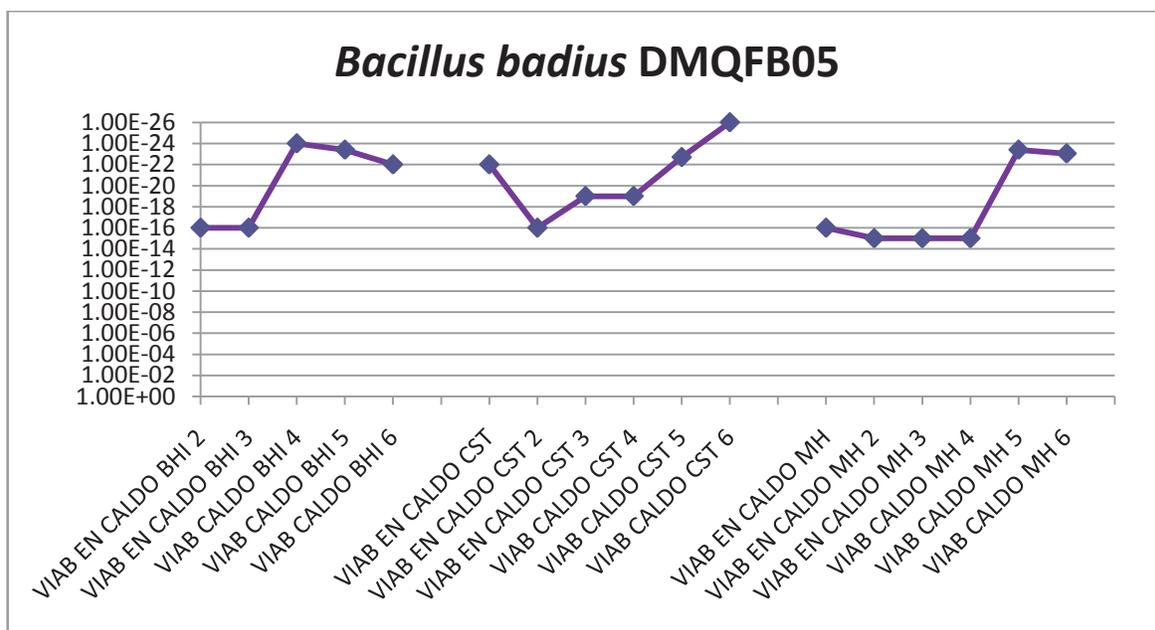


Figura 31. Gráfico de viabilidad de *Bacillus badius*

Los resultados obtenidos y graficados después de la conservación para los tres caldos de recuperación son los siguientes:

Caldo BHI:  $10^{-16}$ ,  $10^{-16}$ ,  $10^{-16}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-22}$

Caldo ST:  $10^{-22}$ ,  $10^{-16}$ ,  $10^{-19}$ ,  $10^{-19}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-26}$

Caldo M-H:  $10^{-16}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-24}$

La cepa de *Bacillus badius* fue aislada de rizósfera de maíz, proveniente del estado de Michoacán, la cual fue aislada e identificada bioquímicamente, en el gráfico se observa una variabilidad de datos los cuales sobrepasan el límite de viabilidad de este ensayo que es de  $10^{-24}$ , debido al número de colonias en la última dilución, cada bimestre se reportó una gran similitud en la recuperación de los tres caldos disponibles para el ensayo.

**Tabla 19. Pruebas bioquímicas de *Bacillus badius***

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial			
<i>Bacillus badius</i>			
Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	-	Salicina	-
Almidón	-	Sorbitol	-
Caseína	+	Trehalosa	-
Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	Tinción de Esporas	+
Voges-Proskauer	-	Bilis-Esculina	-

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento final			
<i>Bacillus badius</i>			
Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	-	Salicina	-
Almidón	-	Sorbitol	-
Caseína	+	Trehalosa	-
Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	Tinción de Esporas	+
Voges-Proskauer	-	Bilis-Esculina	-

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa.

Las pruebas bioquímicas ensayadas para este microorganismo no reportan cambios en el metabolismo después de la conservación.

---

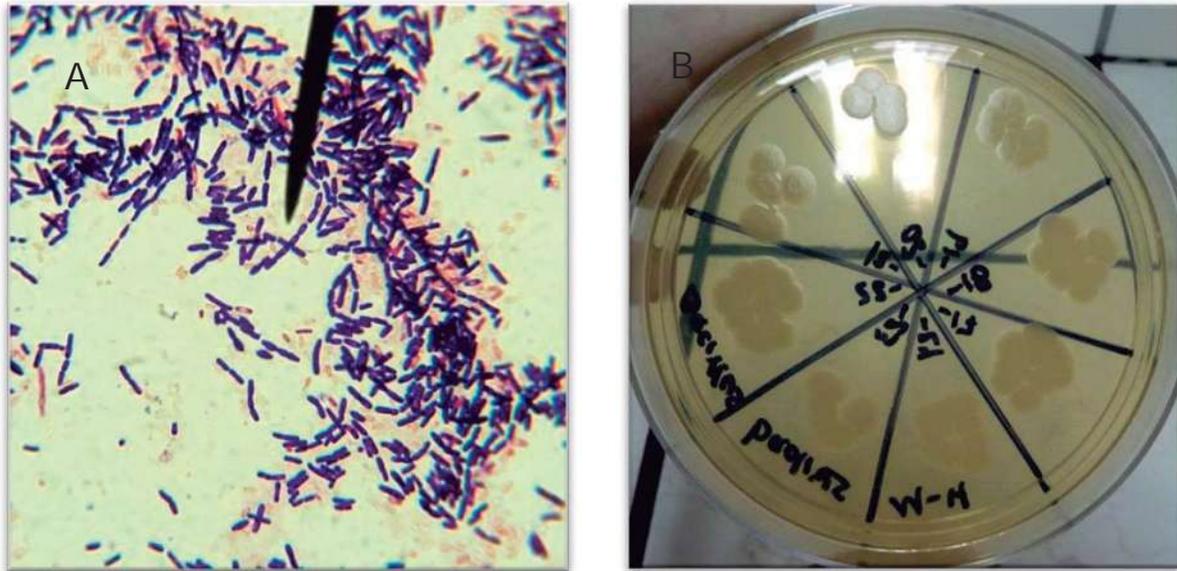


Figura 32. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Bacillusadius*  
A. Tinción gram de *Bacillusadius*; B. Viabilidad de *Bacillusadius* después de doce meses de conservación.

---

### 7.6.4 *Bacillus* spp.

Este género es prototipo de la familia *Bacillaceae*. Son bacilos Grampositivos grandes y esporulados, no exigentes y en general móviles. Incluye bacterias aerobias y anaerobias facultativas. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, algunos forman parte de la flora normal y suelen ser contaminantes de todos los ambientes.

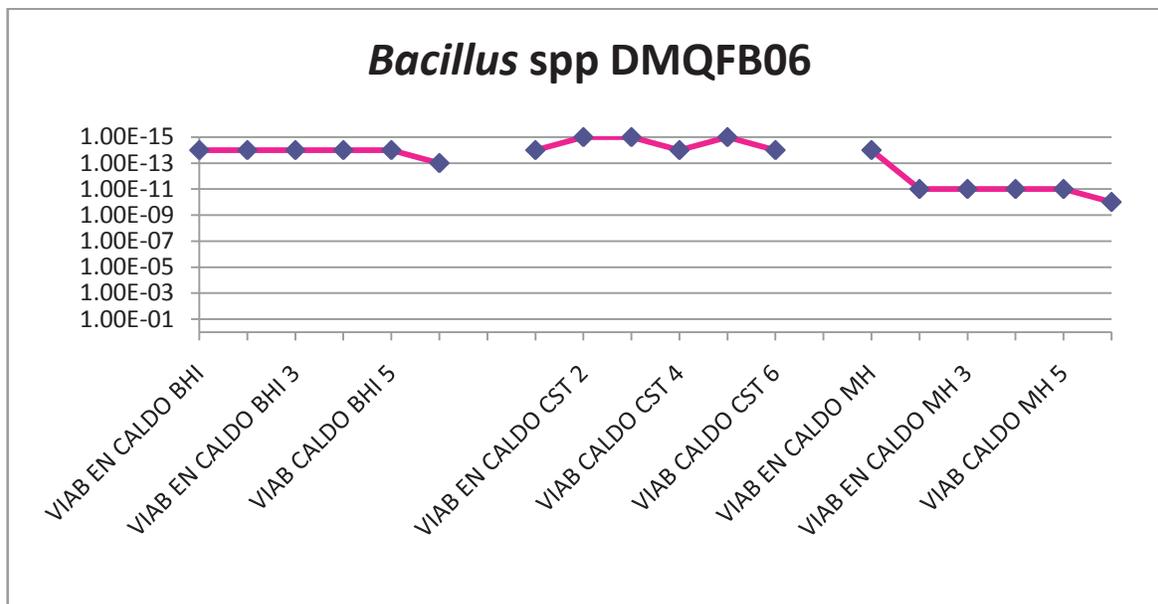


Figura 33. Gráfico de viabilidad de *Bacillus* spp.

Los resultados obtenidos por esta especie del género *Bacillus* graficados bimestralmente y separados en cada uno de los caldos son los siguientes:

Caldo BHI:  $10^{-14}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-13}$

Caldo ST:  $10^{-14}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-15}$ ,  $10^{-14}$

Caldo M-H:  $10^{-14}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$

Esta cepa del género *Bacillus* fue aislada de rizósfera de cacahuate, en la cual no fue posible identificar la especie ya que aunque se utilizaron numerosas pruebas, estas no concordaron con las bases de datos a las que tuvimos acceso para la identificación del

género *Bacillus*. La cepa fue conservada durante 12 meses durante los cuales la mantuvo viabilidades de entre  $10^{-9}$  y  $10^{-15}$ , con una gran similitud entre los caldos de recuperación.

Tabla 20. Pruebas bioquímicas de *Bacillus* spp.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS				PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial				Experimento final			
<i>Bacillus</i> spp.				<i>Bacillus</i> spp.			
Gram	+	Arabinosa	-	Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-	Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+50	Catalasa	+	Fructosa	+50
Lactosa	-	Galactosa	+50	Lactosa	-	Galactosa	+50
Glucosa	+	Glicerol	-	Glucosa	+	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-	Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+	Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	-	Maltosa	+	Lisina	-	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	-	Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-	Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosia	-	Movilidad	+	Melibiosia	-
Indol	-	Myo-Inositol	-	Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-	Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-	Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+	Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	+	Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	-	Salicina	-	Arginina	-	Salicina	-
Almidón	+	Sorbitol	-	Almidón	+	Sorbitol	-
Caseína	+	Trehalosa	+	Caseína	+	Trehalosa	+
Nitratos	-	Xilosa	-	Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	Tinción de Esporas	+	Gelatina	+	Tinción de Esporas	+
Voges-Proskauer	-	Bilis-Esculina	-	Voges-Proskauer	-	Bilis-Esculina	-

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; +50 Fermentador lento.

Los resultados obtenidos por este microorganismo para las pruebas bioquímicas no muestran cambios en el metabolismo de la bacteria.

---

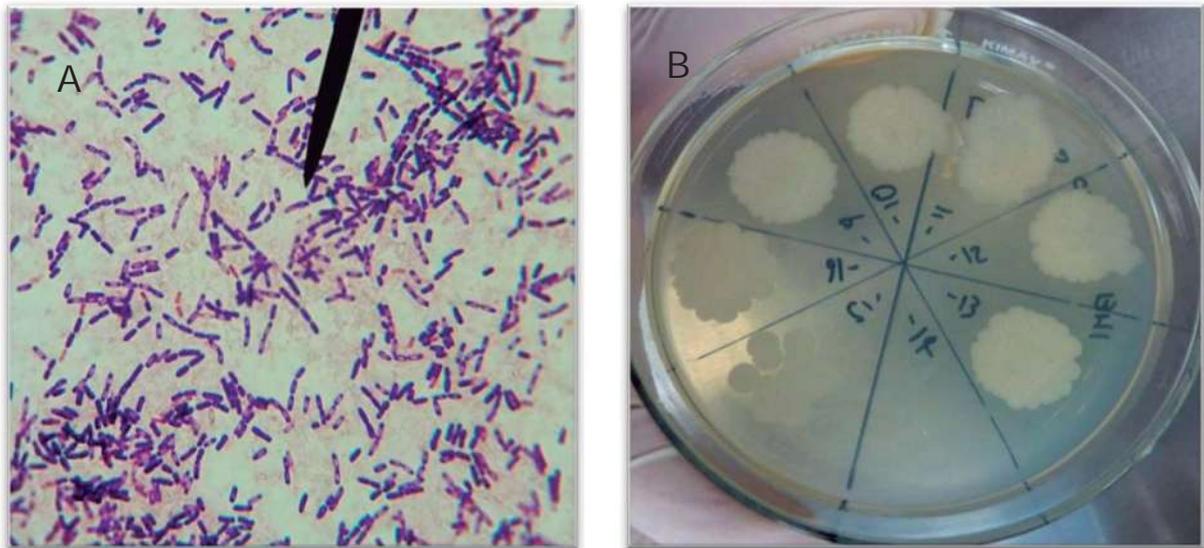


Figura 34. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Bacillus* spp.

A. Tinción gram de *Bacillus* spp.; B. Viabilidad de *Bacillus* spp. después de doce meses de conservación.

---

### 7.6.5 *Paenibacillus alvei*.

El género *Paenibacillus* son bacterias inocuas de tierra perteneciente a la familia *Bacillus*, se encuentra formalmente como un morfotipo del *Bacillus subtilis*, pero debido a las características fisiológicas y genéticas que presenta *Paenibacillus* basados en la secuenciación del gen ARNr 16S, se clasifican en 67 especies de las cuales *Paenibacillus larvae larvae*, es el agente causal del locus americano y *Paenibacillus alvei* el causante de la loque europea que son enfermedades que afectan las larvas de las abejas causando graves pérdidas a los apicultores [Antúnez K. & col 2004].

Otras especies de importancia ecológica son el *Paenibacillus polymyxa* que es un microorganismo que es capaz de fijar el nitrógeno al suelo y por tanto es un promotor del crecimiento vegetal. Por otra parte el *Paenibacillus popilliae* es un microorganismo que causa una infección denominada espina lechosa, en el escarabajo japonés.

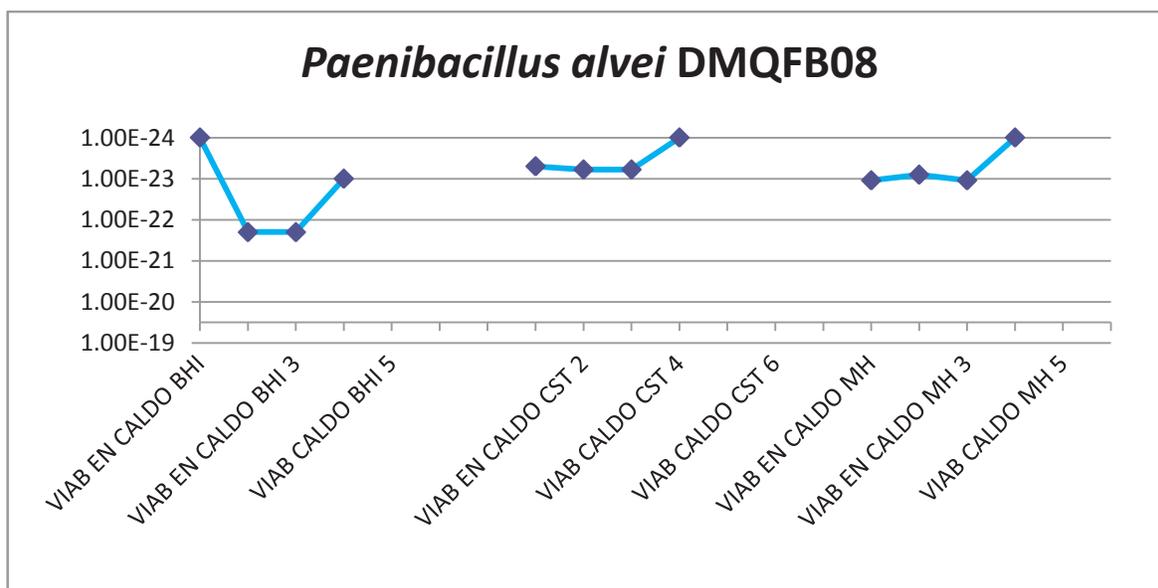


Figura 35. Gráfico de viabilidad de *Paenibacillus alvei*

La cepa del género *Paenibacillus* fue conservada por el método de suelo preparado estéril, durante un periodo de ocho meses, esta fue aislada de rizósfera de zarzamora en el estado de Michoacán, la cual mantuvo las viabilidades más altas en la escala de este

ensayo y a su vez mantuvo sus características bioquímicas intactas ya que el microorganismo es inocuo de suelo por lo que se adaptó fácilmente al cambio de rizósfera.

**Tabla 21. Pruebas bioquímicas de *Paenibacillus alvei***

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial			
<i>Paenibacillus alvei.</i>			
Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+50
Lactosa	-	Galactosa	+
Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	+	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosas	-
Indol	+	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	-	Salicina	+
Almidón	+	Sorbitol	-
Caseína	+	Trehalosa	+
Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	Tinción de Esporas	+
Voges-Proskauer	-	Bilis-Esculina	-

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento final			
<i>Paenibacillus alvei.</i>			
Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+50
Lactosa	-	Galactosa	+
Glucosa	+	Glicerol	+
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	+
Lisina	+	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosas	-
Indol	+	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	-
Rojo de metilo	+	Ribosa	+
Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	-	Salicina	+
Almidón	+	Sorbitol	-
Caseína	+	Trehalosa	+
Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	Tinción de Esporas	+
Voges-Proskauer	-	Bilis-Esculina	-

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; +50 Fermentador lento.

Los resultados de las pruebas metabólicas no muestran cambios en el metabolismo de este microorganismo después de la conservación.

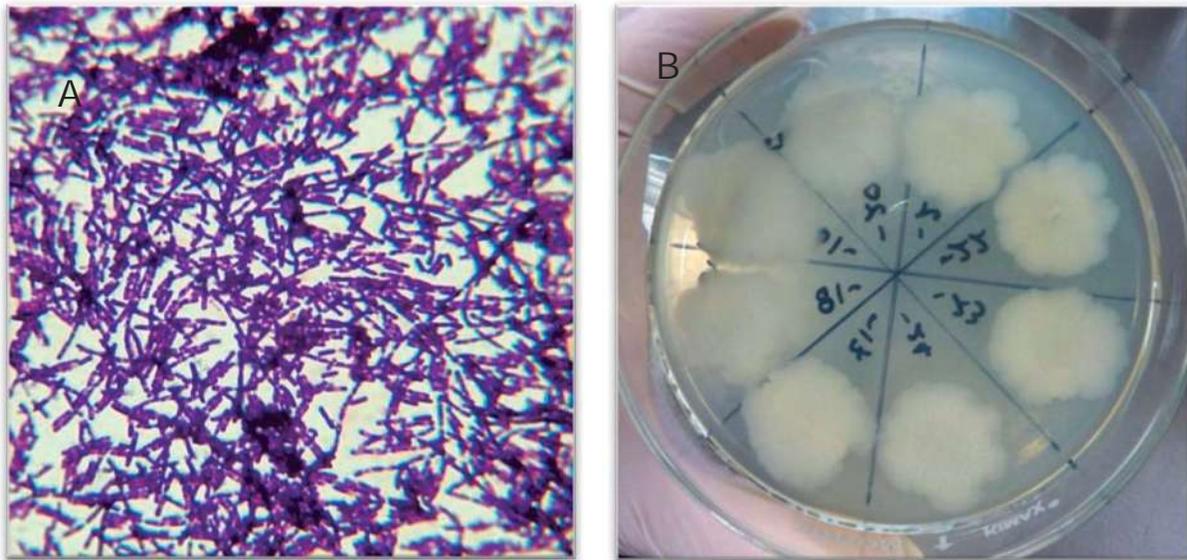


Figura 36. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Paenibacillus alvei*

A. Tinción gram de *Paenibacillus alvei*; B. Viabilidad de *Paenibacillus alvei* después de ocho meses de conservación.

### 7.6.6 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* es una bacteria ampliamente difundida en la naturaleza. Su presencia en los alimentos está determinada por su extensa distribución en el ambiente como en la tierra, aguas, materia fecal, vegetación, y entorno de la producción de alimentos lo que confiere una importante oportunidad para contaminarlos.

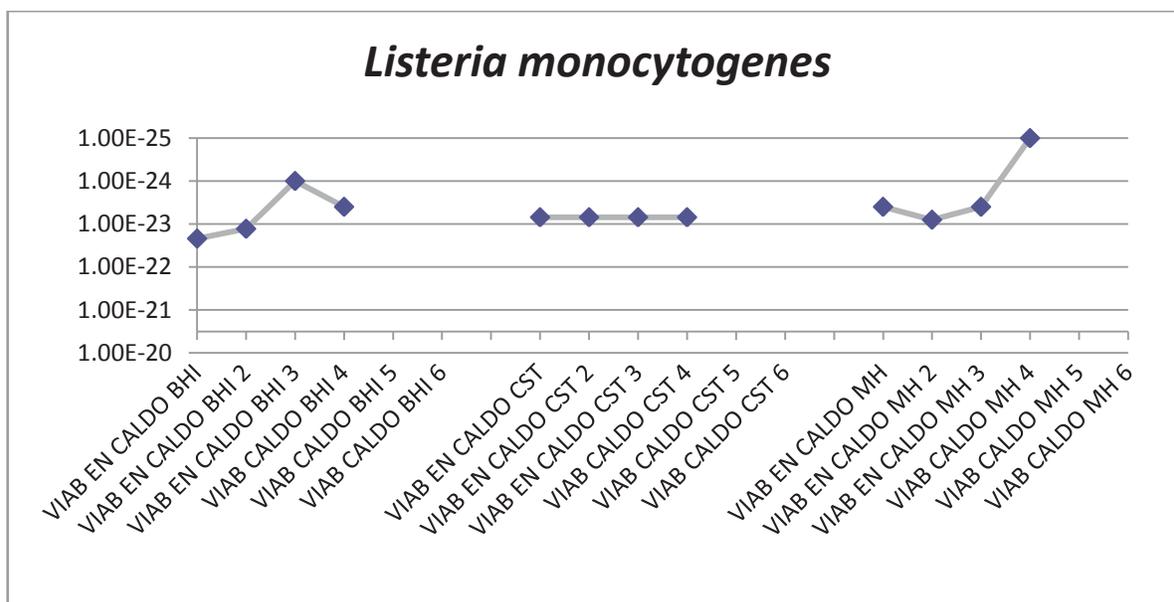


Figura 37. Gráfico de viabilidad de *Listeria monocytogenes*

Los resultados obtenidos y graficados durante el periodo de conservación de este microorganismo muestra los siguientes resultados en cada uno de los caldos de recuperación:

Caldo BHI:  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-24}$

Caldo ST:  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$

Caldo M-H:  $10^{-24}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-25}$

La tercera cepa de *Listeria monocytogenes* que fue conservada en este método fue aislada de la rizósfera de cacahuete del estado de Guanajuato, esta cepa mostró características fenotípicas de otras cepas de origen clínico de *Listeria monocytogenes* con

marcada virulencia. Después de ocho meses de conservación en el método suelo preparado estéril, la cepa mantuvo las viabilidades más altas para este ensayo, al igual que sus características fenotípicas alusivas a factores de virulencia al final de la conservación, cabe destacar que ocurrió lo mismo con sus características metabólicas.

**Tabla 22. Pruebas bioquímicas de *Listeria monocytogenes***

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial			
<i>Listeria monocytogenes</i>			
Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	-
Lisina	-	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	+
Rojo de metilo	+	Ribosa	-
Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	+	Salicina	-
Almidón	-	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	+	Trehalosa	+
Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	CAMP con S. aureus	+
Voges-Proskauer	+	Tinción de Esporas	-

PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento final			
<i>Listeria monocytogenes</i>			
Gram	+	Arabinosa	-
Oxidasa	-	Dulcitol	-
Catalasa	+	Fructosa	+
Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	+	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	-
Lisina	-	Maltosa	+
Citrato	-	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	-	Ramnosa	+
Rojo de metilo	+	Ribosa	-
Ureasa	-	Sacarosa	-
Arginina	+	Salicina	-
Almidón	-	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	+	Trehalosa	-
Nitratos	-	Xilosa	-
Gelatina	+	CAMP con S. aureus	+
Voges-Proskauer	+	Tinción de Esporas	-

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa.

Los resultados de las pruebas realizadas para este microorganismo no muestran cambios metabólicos después de la conservación.

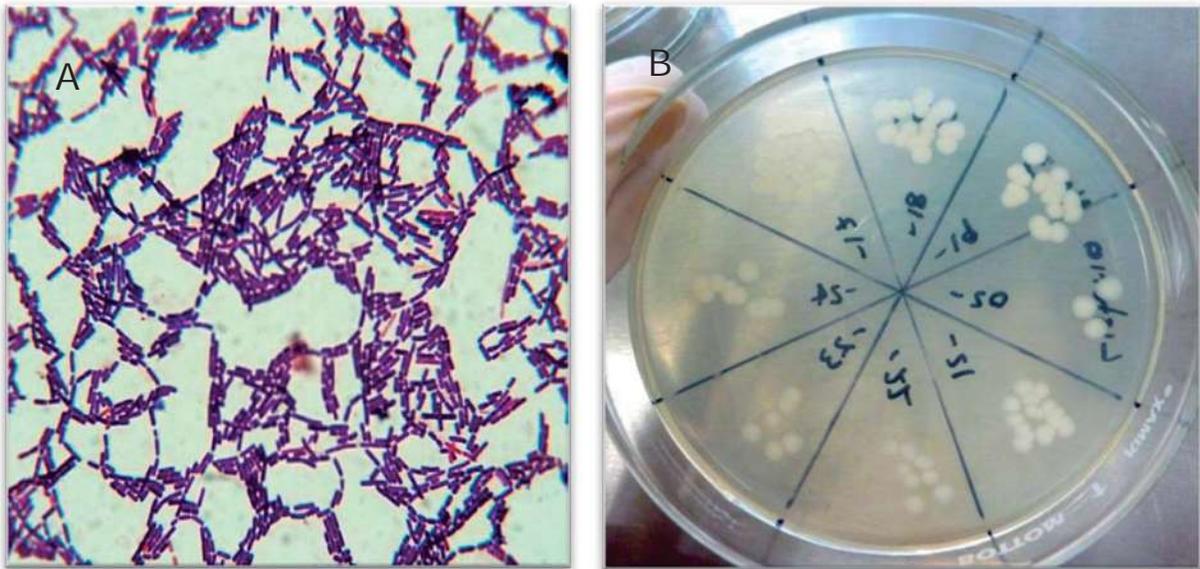


Figura 38. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Listeria monocytogenes*  
A. Tinción gram de *Listeria monocytogenes*; B. Viabilidad de *Listeria monocytogenes* después de ocho meses de conservación.

---

### 7.6.7 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo que se encuentra sobre todo en ambientes húmedos. La tierra, plantas, vegetales, agua corriente y cubiertas pueden actuar como reservorio para este microorganismo, el cual tiene necesidades nutricionales simples. Dada la ubicuidad de *P. aeruginosa*, el simple contacto con el microorganismo no es suficiente para la colonización o para ser el causante de infecciones [Harrison. 2009].

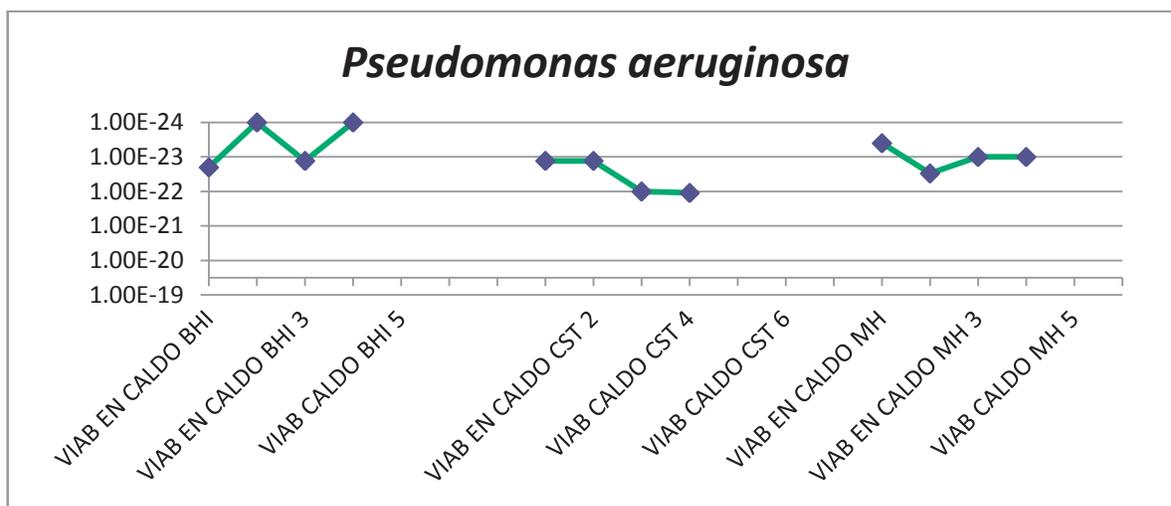


Figura 39. Gráfico de viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa*

Los resultados obtenidos por este microorganismo para cada uno de los caldos de recuperación que bimestralmente se monitorearon son los siguientes:

Caldo BHI:  $10^{-23}$ ,  $10^{-24}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-24}$

Caldo ST:  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-22}$ ,  $10^{-22}$

Caldo M-H:  $10^{-23}$ ,  $10^{-22}$ ,  $10^{-23}$ ,  $10^{-23}$

Ésta segunda cepa de *Pseudomonas aeruginosa* conservada en el método de suelo preparado estéril, fue aislada de una muestra de tierra de jardín en una casa en la ciudad de Morelia. La cepa fue caracterizada bioquímicamente, la cual presenta características

fenotípicas similares alusivas a factores de virulentas presentes en cepas de muestras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, así como pigmentos difusibles muy intensos. La cepa fue conservada por un periodo de ocho meses y mantuvo todas sus características fenotípicas intactas.

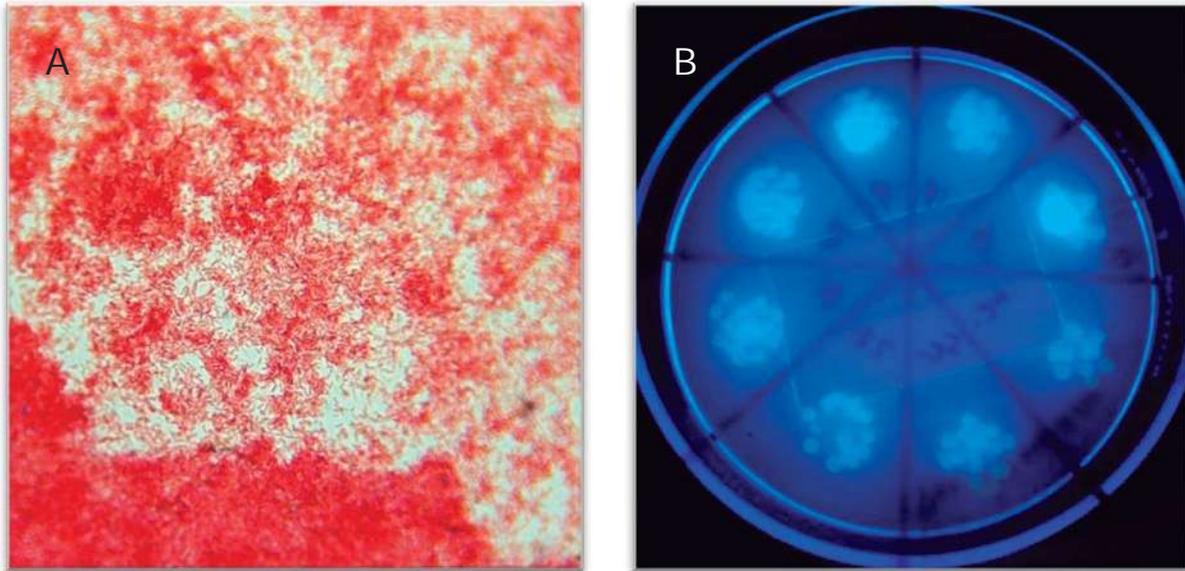
**Tabla 23. Pruebas bioquímicas de *Pseudomonas aeruginosa***

PRUEBAS BIOQUÍMICAS				PRUEBAS BIOQUÍMICAS			
Experimento inicial				Experimento final			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Gram	-	Arabinosa	-	Gram	-	Arabinosa	-
Oxidasa	+	Dulcitol	-	Oxidasa	+	Dulcitol	-
Catalasa	-	Fructosa	-	Catalasa	-	Fructosa	-
Lactosa	-	Galactosa	-	Lactosa	-	Galactosa	-
Glucosa	-	Glicerol	-	Glucosa	-	Glicerol	-
Gas	-	Inositol	-	Gas	-	Inositol	-
Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	-	Ácido sulfhídrico	-	Levulosa	-
Lisina	-	Maltosa	-	Lisina	-	Maltosa	-
Citrato	+	Manosa	-	Citrato	+	Manosa	-
Fenilalanina	-	Manitol	-	Fenilalanina	-	Manitol	-
Movilidad	+	Melibiosa	-	Movilidad	+	Melibiosa	-
Indol	-	Myo-Inositol	-	Indol	-	Myo-Inositol	-
Ornitina	-	Rafinosa	-	Ornitina	-	Rafinosa	-
Malonato	+	Ramnosa	-	Malonato	+	Ramnosa	-
Rojo de metilo	-	Ribosa	-	Rojo de metilo	-	Ribosa	-
Ureasa	-	Sacarosa	+	Ureasa	-	Sacarosa	+
Arginina	+	Salicina	-	Arginina	+	Salicina	-
Almidón	N/E	Sorbitol	-	Almidón	N/E	Sorbitol	-
Bilis-Esculina	-	Trehalosa	-	Bilis-Esculina	-	Trehalosa	-
Nitratos	+	Xilosa	-	Nitratos	+	Xilosa	-
Gelatina	+	Pigmento	+	Gelatina	+	Pigmento	+
Voges-Proskauer	N/E	OF Glucosa	+	Voges-Proskauer	N/E	OF Glucosa	+

(+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa; N/E: prueba no ensayada.

Los resultados del metabolismo bioquímico después de la conservación no muestran cambios metabólicos en el microorganismo.

---



**Figura 40. Análisis de la morfología macro y microscópica de *Pseudomonas aeruginosa***  
**A. Tinción gram de *Pseudomonas aeruginosa*; B. Viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa* después de ocho meses de conservación.**

---

## 7.7 Análisis estadístico de la estabilidad metabólica

### 7.7.1 Cepas de importancia clínica

Las cepas de importancia clínica mostraron tener un mayor número de mutaciones ya que de un 100% de las pruebas metabólicas reportadas en este ensayo, mostraron tener un 96.8% de estabilidad metabólica como se observa en la figura 41.

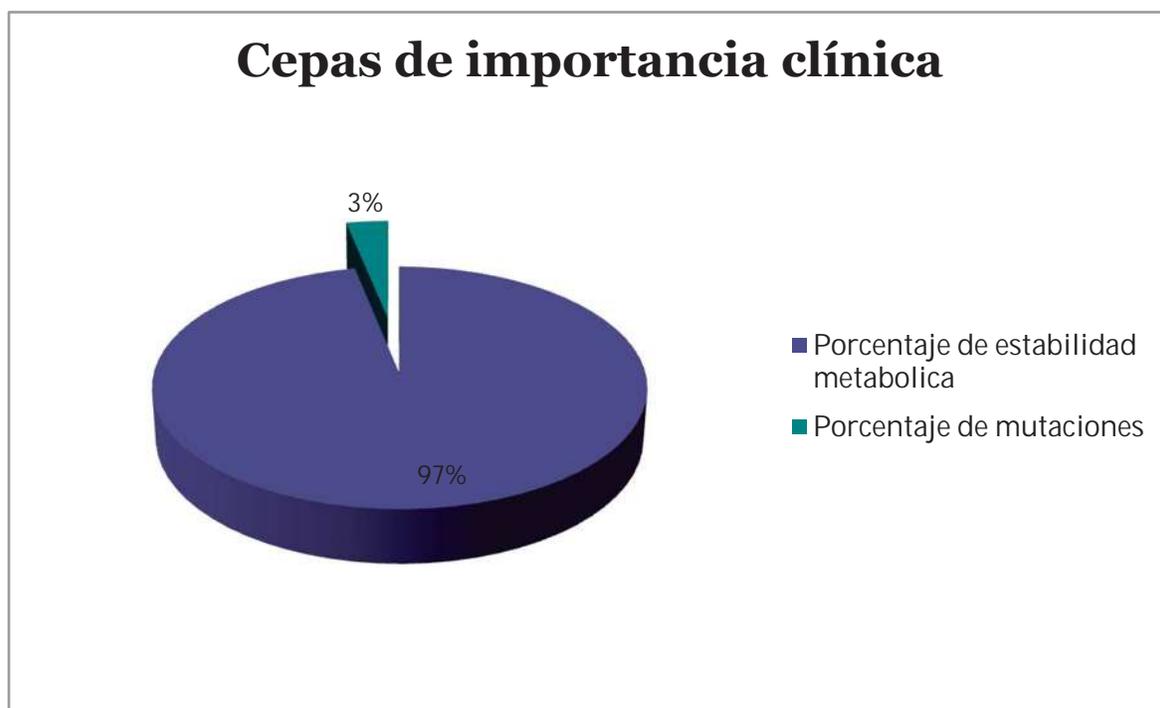


Figura 41. Análisis estadístico del porcentaje de estabilidad metabólica y porcentaje de mutaciones de las cepas de importancia clínica

---

### 7.7.2 Cepas de importancia alimentaria.

Las cepas aisladas de origen alimentario mantuvieron una estabilidad metabólica de un 99% teniendo únicamente variación en la *Escherichia coli*, el resto de las cepas aisladas de origen alimentario no mostraron cambios metabólicos (figura 42).

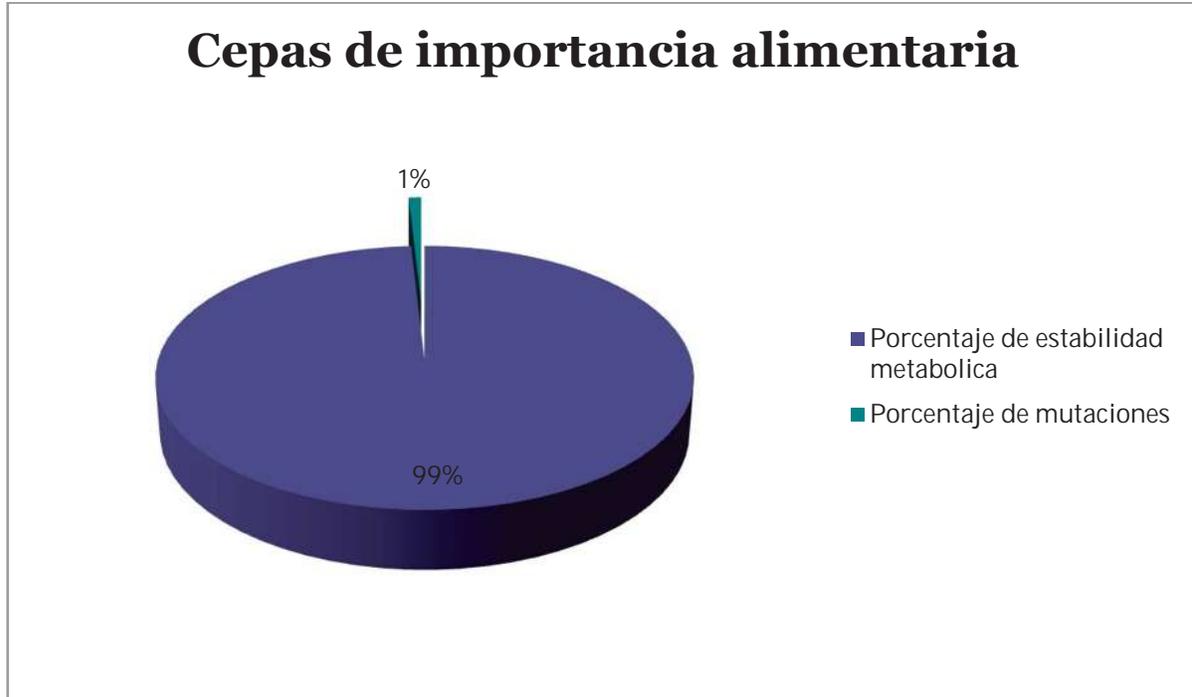


Figura 42. Análisis estadístico del porcentaje de estabilidad metabólica y porcentaje de mutaciones de las cepas de importancia alimentaria.

---

### 7.7.3 Cepas de importancia ecológica.

Las cepas de origen ecológico no tuvieron cambios y mantuvieron una estabilidad metabólica con más del 99%.

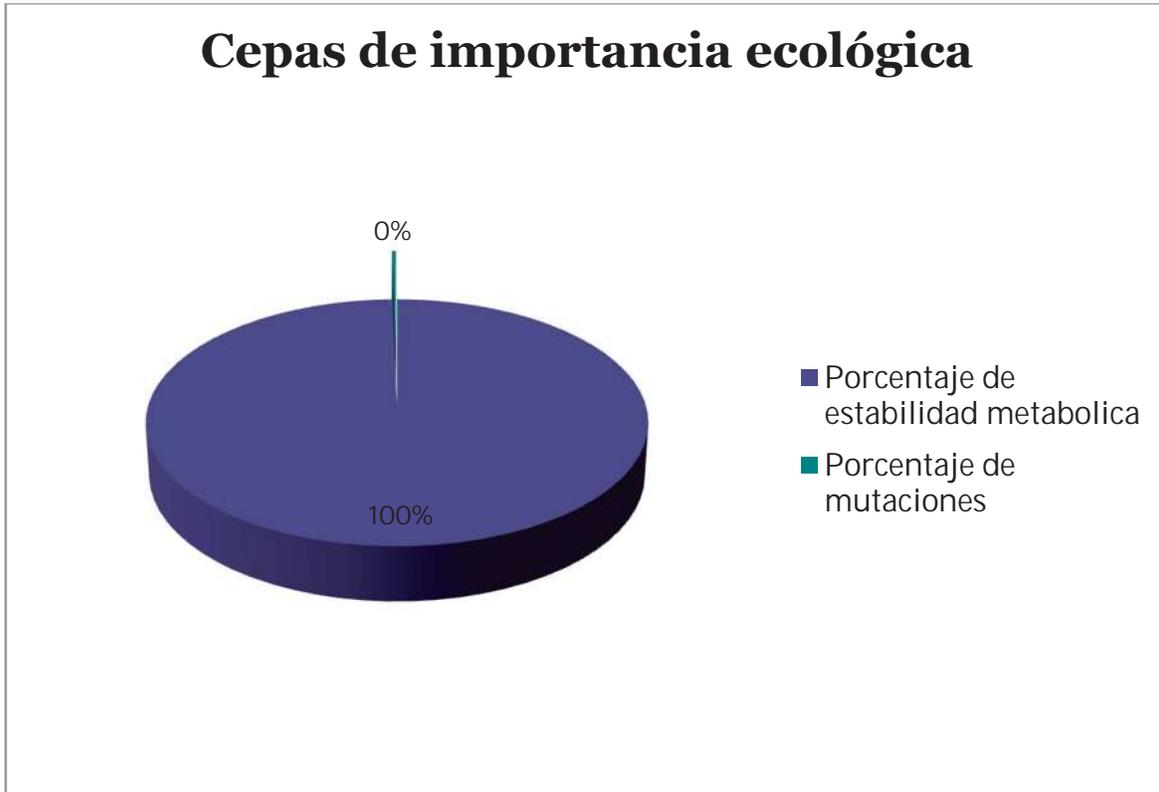


Figura 43. Análisis estadístico del porcentaje de estabilidad metabólica y porcentaje de mutaciones de las cepas de importancia ecológica.

### 7.8 Análisis de DNA plasmídico.

Se realizó el aislamiento y la extracción de plásmidos de las 19 cepas conservadas y a las 19 cepas de antes de la conservación, los cuales mostraron contener diversas moléculas de plásmidos que para este estudio solo tienen la finalidad de otorgar una validación del método de conservación. Ya que no es posible con sólo este experimento de extracción, saber si los plásmidos mostrados en la electroforesis del ADN son plásmidos de resistencia o conllevan otra función dentro del ADN del microorganismo.

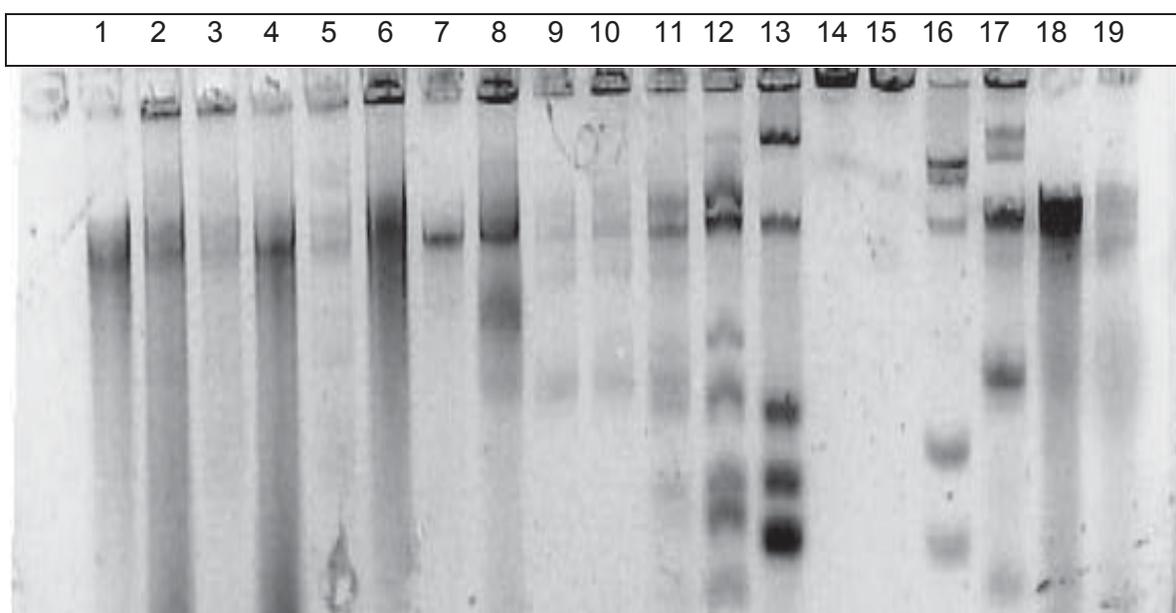


Figura 44.- Análisis electroforético de plásmidos presentes en los aislados bacterianos. Los plásmidos fueron obtenidos utilizando cultivos frescos de 1.- *B. subtilis*; 2.- *B. cereus*; 3.- *B. badius*; 4.- *B. coagulans*; 5.- *B. mycoides*; 6.- *Bacillus* sp.; 7.- *P. alvei*; 8.- *B. megaterium*; 9.-*L. monocytogenes*; 10.- *L. monocytogenes* ; 11.- *L. monocytogenes*; 12.- *S. boydii*; 13.- *S. dysenteriae*; 14.- *P. rettgeri*; 15.- *P. stuartii*; 16.- *E. coli* ATCC 25922; 17.- *E. coli*, 18.- *P. aeruginosa* ATCC 28925; 19.- *P. aeruginosa*.

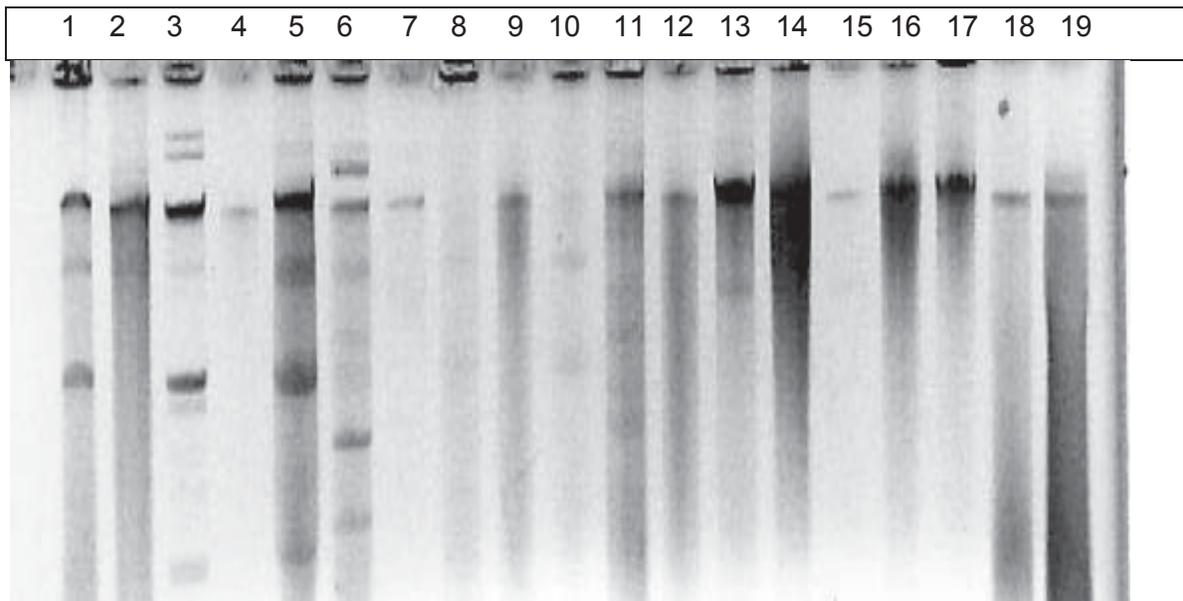


Figura 45.- Análisis electroforético de plásmidos presentes en los aislados bacterianos. Los plásmidos fueron obtenidos de las cepas después de ser conservados en este método utilizando cultivos frescos de 1.- *B. subtilis*; 2.- *B. cereus*; 3.- *B. badius*; 4.- *B. coagulans*; 5.- *B. mycoides*; 6.- *Bacillus* spp.; 7.- *P. alvei*; 8.- *B. megaterium*; 9.-*L. monocytogenes*; 10.- *L. monocytogenes* ; 11.- *L. monocytogenes*; 12.- *S. boydii*; 13.- *S. dysenteriae*; 14.- *P. rettgeri*; 15.- *P. stuartii*; 16.- *E. coli* ATCC 25922; 17.- *E. coli*, 18.- *P. aeruginosa* ATCC 28925; 19.- *P. aeruginosa*.

Los resultados de la extracción confirman la presencia de DNA plasmídico en las cepas bacterianas y como ya se ha mencionado no es posible mediante este único estudio determinar si los plásmidos encontrados son de resistencia a algunos antibióticos o que pudieran corresponder a plásmidos de factores de virulencia o de producción de toxinas etc. Pero la expresión frente a los antibióticos convencionales permite suponer que parte de estos plásmidos le confiera resistencia al microorganismo a algunos de los antibióticos probados en este ensayo.

## 7.9 Evaluación de la resistencia a antibióticos.

Se realizó la prueba de antibiograma por el método de Kirby-Bauer a las 19 cepas después de la conservación para probar su resistencia a antibióticos y así poner de manifiesto si parte de los plásmidos aislados en la electroforesis son de resistencia a antibióticos.

### 7.9.1 Cepas de importancia clínica

---

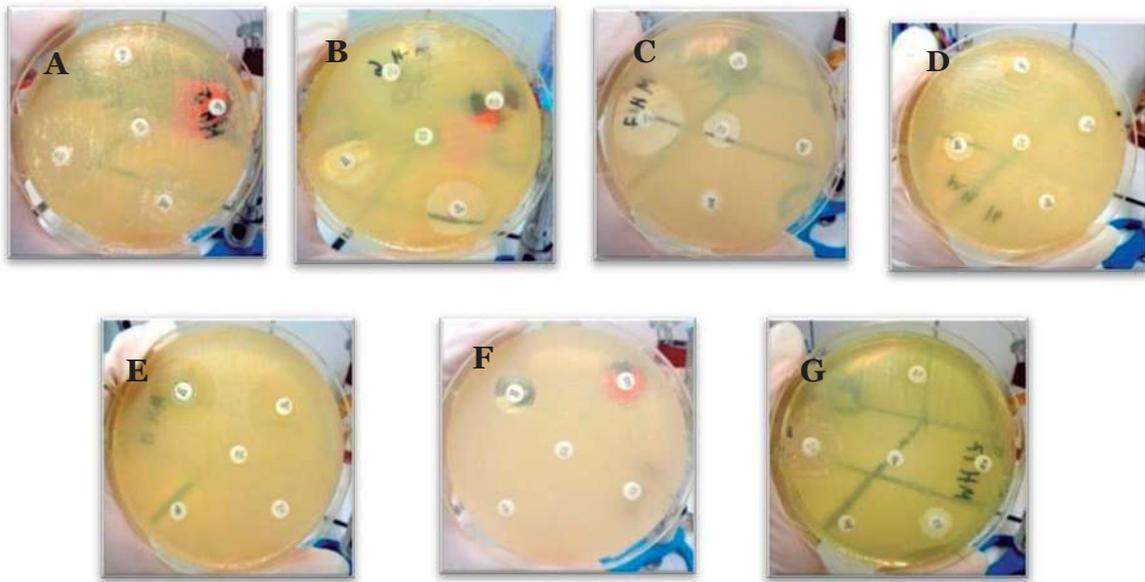


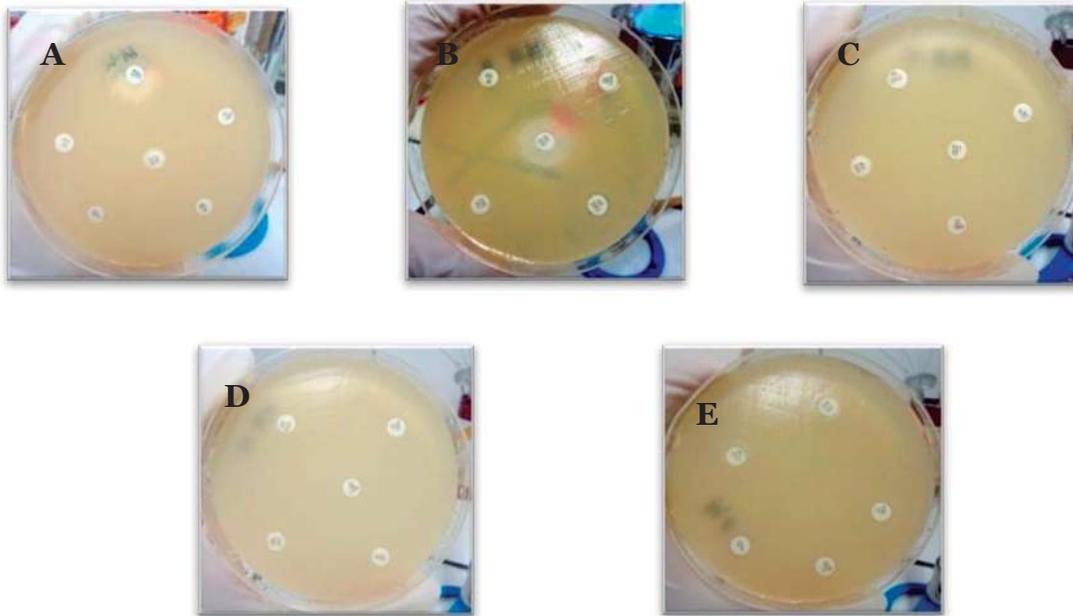
Figura 46. Evaluación de la resistencia a los antibióticos de cepas de importancia Clínica. Se utilizaron cultivos extraídos de la tierra para pruebas de susceptibilidad mostrando resistencia a más de dos antibióticos en todos los casos. A. *Escherichia coli* ATCC 25922; B. *Shigella dysenteriae*; C. *Shigella boydii*; D. *Providencia rettgeri*; E. *Providencia stuartii*; F. *Listeria monocytogenes*; G. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 28953.

Las cepas de importancia clínica mostraron tener mayor sensibilidad a los antibióticos que las bacterias de los otros grupos, pero no mostraron los patrones convencionales de sensibilidad, lo cual puede ser explicado por el contacto previo con antibióticos ya que estas cepas en su mayoría fueron aisladas de pacientes multitratados.

Las cepas de referencia mostraron cambios en la susceptibilidad comparados con la bibliografía desde un inicio de la conservación.

### 7.9.2 Cepas de importancia en alimentos

---



---

Figura 48. Evaluación de la resistencia a los antibióticos de cepas de importancia alimentaria. Se utilizaron cultivos extraídos de la tierra para pruebas de susceptibilidad mostrando resistencia a más de cuatro antibióticos en todos los casos. A. *Listeria monocytogenes*; B. *Escherichia coli*; C. *Bacillus cereus*; D. *Bacillus subtilis*; E. *Bacillus coagulans*.

Las cepas aisladas de alimentos mostraron gran resistencia a los antibióticos que se probaron, esto se puede predecir debido a que al encontrarse en un medio hostil, la inhibición por competencia provee a la bacteria de características propias de la adaptación celular.

### 7.9.3 Cepas de importancia ecológica

---

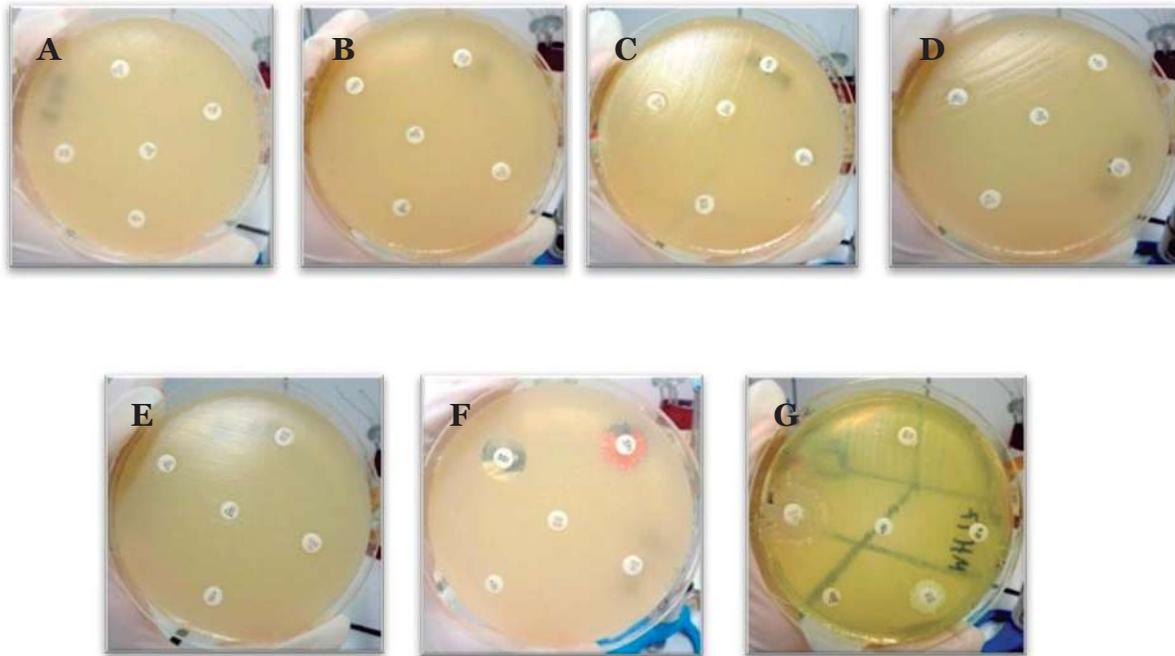


Figura 45. Evaluación de la resistencia a los antibióticos de cepas de importancia ecológica. Se utilizaron cultivos extraídos de la tierra para pruebas de susceptibilidad mostrando resistencia a más de cuatro antibióticos en todos los casos. A. *Bacillus mycoides*; B. *Bacillus megaterium*; C. *Bacillus badius*; D. *Bacillus* spp.; E. *Paenibacillus alvei*; F. *Listeria monocytogenes*; G. *Pseudomonas aeruginosa*.

Las cepas ubicuas de tierra mostraron una resistencia absoluta a todos los antibióticos debido a que al subsistir de forma natural en suelo como ambiente generador de estrés y competencia entre microorganismos, genera una selección natural lo que propicia que estos microorganismos adquieran mecanismos de defensa y resistencia frente a las agresiones y al medio ambiente.

## 8. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden derivar a partir de los resultados obtenidos y discutidos en este trabajo son:

1. La incorporación de dos métodos alternos para conservación como son la conservación en tierra y la desecación sobre diversos materiales, modificando los sustratos utilizados, obtuvimos un método a largo plazo sencillo, que reduce los costos de la conservación siendo accesible para la mayoría de los laboratorios.
2. La innovación al método de conservación en suelo estéril modificado, tuvo una eficacia de entre 95 al 100% para bacterias ubicuas de tierra ya que conservó completamente sus propiedades metabólicas, DNA plasmídico así como sus características macro y microscópicas.
3. Las cepas no ubicuas de tierra fueron aptas para sobrevivir al medio al que se les incorporó utilizando sus capacidades de adaptación metabólica y manteniendo una eficacia de entre un 93 a un 98%.
4. Todas las cepas conservadas en este método presentaron plásmidos antes y después de la conservación lo cual es un parámetro de validación para el método, ya que involucra la estabilidad del material genético.
5. Se demostró que los caldos de recuperación probados en este ensayo no son eficaces para la recuperación de todos los microorganismos por lo que se deben implementar al menos 2 caldos para la recuperación de cualquier cepa.
6. El método de conservación en suelo preparado estéril, es válido para la conservación de cepas a largo plazo, no estando exento de la generación de mutaciones, como en cualquier método de conservación por costoso que sea.
7. El método de conservación en suelo preparado estéril es un método a largo plazo económico ya que para su utilización los materiales y equipos que se requieren son básicos y económicos, accesibles para cualquier laboratorio y su almacenamiento es a temperatura ambiente en oscuridad.

## 9. ANEXOS

### 9.1 Métodos

#### 9.1.1 Tinción Gram

Reactivos:

Solución A: Violeta de Genciana, Cristal Violeta ó Violeta de Metilo

Violeta de genciana, cristal violeta ó violeta de metilo.	2 g.
Etanol 95%	20 ml.

Solución B: Yodo-Lugol

Yodo (I <sub>2</sub> )	1 g.
Yoduro de Potasio (KI)	2 g.
Agua destilada	300 ml.

Solución C: Alcohol – Cetona

Alcohol 95%	100 ml.
Cetona	50 ml.

Solución D: Safranina

Safranina	2.5 g.
Etanol 95%	100 ml.

Procedimiento de la tinción:

Previo a los colorantes se debe realizar un frotis con el microorganismo que se desea teñir el cual se fija al aire y pasa por el mechero un par de veces, una vez que se seco el

frotis se agrega cristal violeta, violeta de genciana o violeta de metilo hasta cubrir el frotis durante un minuto, se lava brevemente con agua y se agrega el Iodo-lugol durante un minuto y se lava a chorro de agua, después de esto se decolora con el alcohol-cetona hasta que se libera el colorante y se lava con agua, finalmente se le agrega la safranina o la fucsina básica durante un minuto y se lava con agua a chorro, se seca y se examina al microscopio.

### 9.1.2 Tinción para Endosporas

Reactivos:

Solución A

Verde de Malaquita.	10 g.
Agua destilada	100 ml.

Solución B

Safranina.	0.25 g.
Agua destilada	20 ml.

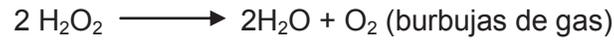
La tinción de endosporas o de Shaeffer-fulton utiliza una solución de Verde de Malaquita al 10% la cual al calentarse permite la entrada en los ácidos grasos de la espora y al enfriarse atrapa al colorante de forma permanente y en contraste se utiliza la safranina para visualizar el resto de la bacteria.

Procedimiento:

Previo a los colorantes se prepara un frotis que se fija al calor, se coloca en un puente de vidrio y se le agrega Verde de Malaquita al 5% calentando ligeramente con el mechero de bunsen hasta emisión de vapores por espacio de un minuto sin dejar evaporar el colorante y se lava a chorro de agua hasta eliminar el exceso de colorante, posterior a eso se cubre el frotis con safranina durante 30 segundos y se lava a chorro de agua, se seca y se observa en el microscopio.

### 9.1.3 Prueba de la Catalasa

La catalasa actúa según la siguiente reacción:



Procedimiento:

- 1.- Con un aplicador de madera, transferir parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos de vidrio.
- 2.-Agregar una gota de peróxido de hidrogeno al 4% y observar la formación de burbujas que nos indica una prueba positiva.

### 9.1.4 Prueba de la N-N-N-N-Tetrametil-P-Fenilendiamina (oxidasa)

Reactivo:

Discos comerciales para Oxidasa TAXO® marca BD BBL® para diagnostico in vitro.

Procedimiento:

Se transfiere una pequeña cantidad de cultivo a un disco de papel filtro impregnado con el reactivo de Oxidasa con un aplicador de madera, la formación de un color púrpura dentro de los diez segundos posteriores indica que el ensayo es positivo.

No se recomienda utilizar asas microbiológicas ya que contienen alambre de Nichromo que generalmente dará reacciones falsas positivas.

### 9.1.5 Prueba de Voges–Proskauer

Para este ensayo se utiliza el medio de cultivo caldo RM/VP

Reactivos:

Solución A:  $\alpha$ -Naftol al 5%

A-Naftol	5 g.
Alcohol absoluto	100 ml.

Solución B: KOH 40%

Hidróxido de Potasio	40 g.
Agua destilada	cbp. 100 ml.

El producto activo del medio, es formado por el metabolismo bacteriano y es el acetyl metil carbinol, producto de la vía del butilenglicol.

Procedimiento:

Inocular un tubo de caldo RM/VP con un cultivo puro del microorganismo a ensayar e incubar 24 horas a 37°C. Finalizada la incubación, transferir 1 ml. Del caldo a un tubo de ensayo limpio. Agregar 0.6 ml de  $\alpha$ -Naftol al 5%, seguidos de 0.2 ml de KOH al 40%. Es esencial seguir este orden. Agitar suavemente el tubo para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejar reposar el tubo durante 10 ó 15 minutos.

Los resultados de la prueba no deben leerse más allá de una hora después de dejar los tubos en reposo ya que los microorganismos VP negativos pueden producir un color cobrizo que se puede interpretar como un falso positivo.

### 9.1.6 Prueba de Cristie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP)

Procedimiento:

En una placa de agar sangre de carnero sembrar una estría de la cepa de *S. aureus* y, paralelamente una de *R. equi*, separadas lo suficiente para que entre éstas se puedan estriar perpendicularmente las cepas sospechosas de *Listeria*, sin que lleguen a tocarse (aproximadamente 5 mm de separación). Después de 24 y 48 h de incubación a 35°C observar el sinergismo entre las hemolisinas de *S. aureus*, *R. equi* y *Listeria* que se manifiesta como una zona hemolítica más intensa en forma de punta de flecha.

## 9.2 Medios de Cultivo

### 9.2.1 Agar Rojo de Fenol + Azúcar fermentable

Caldo Rojo de Fenol	15 g.
Agar-Agar	13.5 g.
Azúcar fermentable	1%
Agua destilada pH final 7.2 ± 0.2	1000 ml.

Preparación:

Se suspenden los ingredientes en 1000 ml. De agua destilada y calientan hasta hervir a fuego lento, se vierte en volúmenes de 3.5 ml en tubos de 13X100 con tapón de rosca y se esteriliza a 110°C por 5 minutos. Posterior a la esterilización se inclinan y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Dependiendo del azúcar utilizado sembrar microorganismos de referencia para efectos de control de calidad.

### 9.2.2 Agar almidón

Agar nutritivo	23 g.
----------------	-------

Almidón de papa soluble	10 g.
Agua destilada	1000 ml.
pH final $7.2 \pm 0.1$	

Preparación:

Calentar para disolver el agar en 500 ml de agua. Disolver en 250 ml de agua el almidón, combinar y diluir a un litro. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Homogenizar y distribuir asépticamente en tubos estériles de 16X100 en volúmenes de 10 ml. Poner en plano inclinado y dejar enfriar a temperatura ambiente.

Para la revelación de la hidrólisis del almidón se utiliza yodo-lugol, un vire en la coloración del medio a negro indica una prueba positiva.

### 9.2.3 Agar Arginina

Möller medio decarboxilasa base	10.5 g.
L-Arginina	1%
Agar-Agar	13.5 g.
Purpura de bromocresol	0.01 g.
Agua destilada	1000 ml.
pH final 6.8 – 7.0	

Preparación:

Suspender los ingredientes en el agua destilada y calentar hasta ebullición, distribuir en volúmenes de 4 ml. En tubos de 13X100 esterilizar a 121°C de 10 a 12 minutos, dejar solidificar inclinando los tubos lo necesario para obtener una superficie de inclinada de 4 cm y una profundidad de 3 cm.

#### 9.2.4 Agar Nitrato

Caldo Indol-Nitrito	25 g.
Agar-Agar	13.5 g.
Azul de bromotimol	0.02 g.
Agua destilada pH 7.2 ± 0.1	1000 ml.

Preparación:

Suspender los ingredientes en un litro de agua, mezclar y dejarlo reposar de 10 a 15 minutos. Agitar calentando con frecuencia y hervirlo durante un minuto, distribuir en tubos de 13X100 con tapón de rosca en volúmenes de 2.5 ml. y esterilizar a 115°C durante 15 minutos, dejar enfriar en plano inclinado a temperatura ambiente.

#### 9.2.5 Gelatina Bacteriológica

Peptona de carne	5 g.
Extracto de carne	5 g.
Grenetina	120 g.
Agua destilada pH 6.9 ± 0.1	1000 ml.

Preparación:

Suspender los ingredientes en un litro de agua, mezclar y dejarlo reposar de 10 a 15 minutos para hidratar la gredina. Agitar calentando con frecuencia y hervirlo durante un minuto, distribuir en tubos de 13X100 con tapón de rosca en volúmenes de 1.5 ml. y esterilizar a 115°C durante 15 minutos.

### 9.2.6 Agar Leche

Caldo nutritivo	8 g.
Leche descremada en polvo	25 g.
Agar-Agar	15 g.
Agua destilada pH final 7.2 ± 0.2	1000 ml.

Preparación:

Suspender el caldo nutritivo en 500 ml de agua destilada, reposar 15 minutos, hervir hasta dilución y esterilizar. Suspender la leche en polvo en 500 ml de agua, esterilizar. Mezclar las dos soluciones de forma aséptica y envasar en cajas petri.

## 9.3 Soluciones y Reactivos

### 9.3.1 Reactivo de Kovac

Alcohol amílico ó Isoamílico puro	150 ml.
p-dimetil-amino-benzaldehído	10 g.
HCl concentrado	50 ml.

Mezclar los reactivos y envasar en goteros de 20 ml. probar reactivos con cepas control en medios de cultivo específicos.

### 9.3.2 Reactivo de Cloruro Férrico

Cloruro férrico	12 g.
HCl concentrado	2.5 ml.
Agua destilada	cbp. 100 ml.

Aforar, mezclar y envasar en frascos con gotero de 20 ml. probar reactivo con cepas control en medios de cultivo específicos.

### 9.3.3 Reactivo de Rojo de Metilo

Rojo de metilo	0.1 g
Alcohol etílico al 95%	300 ml.
Agua destilada	200 ml.

Disolver el rojo de metilo en el alcohol y posteriormente agregar el agua destilada, envasar en goteros de 20 ml. probar reactivos con cepas control en medios de cultivo específicos.

### 9.3.4 Peróxido de hidrogeno al 3%

Peróxido de hidrogeno con 11 volúmenes de oxígeno.	3 ml.
Agua destilada	cbp. 100 ml.

Aforar, mezclar y envasar en frascos con gotero de 20 ml. probar reactivo con cepas control en medios de cultivo específicos.

### 9.5 Nefelómetro de MacFarland

El Nefelómetro de MacFarland establece una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. Creamos 10 estándares y por espectrofotometría, creamos una recta patrón, de forma que vamos a poder detectar la concentración de nuestras diluciones bacterianas (de manera aproximada, ya que depende de factores como el tamaño de la bacteria, la formación de agregados; etc.). La escala se basa en la capacidad de precipitación del  $\text{BaCl}_2$  (cloruro de bario) en presencia de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ácido sulfúrico).

TUBO	$\text{BaCl}_2$ al 1%	$\text{H}_2\text{SO}_4$ al 1%	U.F.C./ml
1	0.1	9.9	$3 \times 10^8$
2	0.2	9.8	$6 \times 10^8$
3	0.3	9.7	$9 \times 10^8$
4	0.4	9.6	$1.2 \times 10^9$
5	0.5	9.5	$1.5 \times 10^9$
6	0.6	9.4	$1.8 \times 10^9$
7	0.7	9.3	$2.1 \times 10^9$
8	0.8	9.2	$2.4 \times 10^9$
9	0.9	9.1	$2.7 \times 10^9$
10	1.0	9.0	$3 \times 10^9$

## 10. Bibliografía

- Janet E.L. Corry. 1982. Quality assessment of culture media by the Miles-Misra Method. In: Quality Assurance and quality control of microbiological culture media.pp 21-37
- Miles, A. A., S. S. Misra, and J. O. Irwin. 1938. The estimation of bactericidal power of blood. J. Hyg. 38:733–749.
- Koneman & col. Diagnóstico microbiológico, texto y atlas en color. 2008. Varias Pp.
- Morgan C.A., Herman N., White P.A. Vesey G. Preservation of micro-organisms by drying; A review. Journal of Microbiological methods 2006; 66:183-193.
- Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. clin. Phathol. 45:493-469.
- Arcos M, Ossa F, Díaz T. Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. CORPOICA. Oct 2004; 5(1):60-63.
- Wald S`et al`. UNDERPINNING THE FUTURE OF LIFE SCIENCES AND BIOTECHNOLOGY ``Junio 1999 a mayo 2001``. BIOLOGICAL RESOURCE CENTRES. Mar 2001:1-65.
- Parra Huerta S, Pérez Casas M, Bernal Morales M, Suárez Moreno Z, Montoya Castaño D. Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del instituto de biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN).Nova.2006 Ene-Jun; 4(005):39-49.
- Del Puerto C, Iglesias E, Morales T, Baños N, Nocedo M, Carnota G, ``et al``. Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. VacciMonitor.2009 Feb; 18(1):20-24.
- Consuelo Sánchez Leal L MSc, Corrales Ramírez L MSc. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Nova. 2005 Oct 27:21-29.
- Arteaga Rivera R. El biofilm de *Aeromonas spp* y su relación con el sistema flagelar como mecanismo de patogenicidad y resistencia [Tesis Doctoral]. México, DF: Instituto Politécnico Nacional;2009

- Weng Alemán Z, Junco Díaz R, Díaz Rosa O. Evaluación de medio semisólido para la conservación de microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae*. REV CUBANA MED TROP 2003; 55(3):210-2.
- Garay E, Anzar R, Lalucat J, Ribas F. Informe técnico sobre cepas de trabajo en el laboratorio de análisis microbiológico. Comisión de validación y normalización; 2006 nov. Primera edición.
- Weng Alemán Z, Junco Díaz R, Díaz Rosa O, Álvarez Molina I, Beltrán Díaz J, Rodríguez Salazar M. Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. Revista cubana Higiene y Epid 2005; 43(2).
- Weng Alemán Z, Junco Díaz R, Álvarez Molina I. Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer?. Revista cubana Higiene y Epid 2005; 43(3).
- Torres Higuera L, Ortiz Ortega D, Rodríguez Bautista J, Patiño Burbano R. Comparación de tres tratamientos para la crioconservación de serovares de *Leptospira* en nitrógeno líquido. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria (2008) 9(2), 72-76.
- Sánchez Leal L. C., Corrales Ramírez L. C. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 2005 oct 27; 21-29.
- Castro Escarpulli G, Aguilera Arreola M. G, Giono Cerezo S, Hernández Rodríguez C. H, Rodríguez Chacón M, Soler Fálgas L, Aparicio Ozores G, Figueras Salvat M, J. El género *Aeromonas*. ¿Un patógeno importante en México?. Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, AC. 2002 oct-dic; 22(4): 206-216.
- Martínez Cruz J. Informe final\* del Proyecto E016 Colección de microorganismos del CINESTAV-IPN: Fase I, Base de datos. México, DF: Colección Nacional de Cultivos Microbianos CINESTAV-IPN; 1996.
- López Merino A. Agentes infecciosos. Rev. Latinoamericana de Microbiología. 2006 abr-jun; 48(2):146-153.
- Majano Mendoza A, Bravo Fariñas L, Fernández Abreu A, Martínez Motas I, Núñez F, Mederos Cuervos L. M, Ramírez Álvarez M, Castro Escarpulli G. Caracterización fenotípica de bacilos gramnegativos anaerobios facultativos oxidasa positiva, aislados de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba. Rev. Biomed 2009; 20:25-32.

- Fernández Natal M. I. Identificación y poder patógeno de microorganismos del género *corynebacterium* aislados de muestras clínicas [Tesis Doctoral]. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid; 2010.
- Blanc Pociello V. Caracterización de cepas y de plásmidos de Enterobacteriaceae portadores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido [Tesis] Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona; 2007.
- ATCC, en catalogo de cepas. 9a ed., 1970.
- Bousfield, I.J. y MacKenzie, A.R. 1976. *An inhibition and Inactivation of vegetative Microbes*. Ed. F.A. Skinner y W.E. Hugo. Academic Press. England. Pp. 329-244.
- Heckly, R.J. 1961. *Preservation of Bacteria by Lyophilization*. En *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 3 Ed. W. W. Umbreit. Acad. Press, N. Y. pp. 1-76.
- Ilzucka, H. y T. Masegowa. 1970: *Culture Collections of Microorganisms*. University Park Press, U.S.A.
- Lapage, S. P. y J. E. Shelton. 1970: *Culture Collections and the Preservation of Bacteria*. In *Methods in Microbiology*. Vol. 3. ed., J. A. Norris y W. Ribbons. Acad. London and N.Y. pp. 135-228.
- Munguía Pérez, J. L. 1974: *Sugerencias en la organización y manejo de un cepario microbiano*. E.N.C.B. del I.P.N. Tesis.
- NCTC, en Catálogo de cepas. 1972. Public Health Laboratory
- Munguía Pérez, J. L. 1974: *Sugerencias en la organización y manejo de un cepario microbiano*. E.N.C.B. del I.P.N. Tesis. 8. NCTC, en Catálogo de cepas. 1972. Public Health Laboratory.
- Garay E., Aznar R., Lalucat J., Ribas F. Informe técnico sobre cepas de trabajo en el laboratorio de análisis microbiológico. 2006. [Consulta en línea]. 20 mayo 2010. URL: <http://www.cect.org/docs/cepasdetrabajo.pdf>
- Guía Técnica para la evaluación y prevención de riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos. Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo BOE nº 124, de 24 de mayo. CECT. [Consulta en línea]. 20 de mayo de 2010. URL: [http://www.cect.org/docs/agentes\\_biologicos.pdf](http://www.cect.org/docs/agentes_biologicos.pdf)
- Rodríguez Lemoine V., Vitelli Flores J. & col. Catalogo del centro venezolano de colecciones de microorganismos – IBE 2006. [Consulta en línea] 15 de junio de 2010 URL: <http://cvcm.ciens.ucv.ve/Content/CATALOGO%20CVCM%202006.html>

- González R.A. & col. Aseguramiento de la calidad de colecciones de cultivos. Centro nacional de sanidad agropecuaria. 2008. [Consulta en línea]. 15 de junio 2010 URL: <http://www.docstoc.com/docs/3177499/Aseguramiento-de-la-Calidad-en-las-Colecciones-de-Cultivos-Microbianos>
- Anderson N. Plasmid DNA isolation. Biotech proyect 1997. [Consulta en línea]. 15 de junio de 2010. URL: [http://biotech.biology.arizona.edu/labs/DNA\\_isolation\\_plasmid.html](http://biotech.biology.arizona.edu/labs/DNA_isolation_plasmid.html)
- Llanes Rodriguez N. Procesamiento de cepas para realizar el antibiograma. 2008. [Consultado en línea] 15 de junio de 2010. URL: <http://www.hospitalameijeiras.sld.cu/hha/mpm/documentos/MICROBIOLOGIA/GP/PROCESAMIENTO%20DE%20CEPAS%20PARA%20REALIZAR%20EL%20ANTIBIOGRAMA.pdf>
- Nimnoi P., Lumyong S., Pongsilp N. Impact of rhizobial inoculants on rhizosphere bacterial communities of thee medicinal legumes assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Springer-Verlag and the University of Milan 2010.
- Hatt, H. (ed.). American Type Culture Collection Methods: I. Laboratory manual on preservation, freezing and freeze-drying. American Type Culture Collection. Rockville (1980).
- Day, J.G and McLellan, M.R. (eds.) "Cryopreservation and freeze-drying protocols". Humana Press. Totowa. New Jersey (1995).
- María Dolores García López y Federico Uruburu Fernández. "Manual de conservación de cepas microbianas". Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Universitat de València. 46100 Burjassot (2000).
- Basu S, Pal A, Desai PK. Quality control of culture media in a microbiology laboratory. 2005;23(3):159-163.