



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera Química Farmacéutico Biológica

Implementación de un método de conservación
de cepas bacterianas

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

García López Edgar

BIOQUÍMICA CLÍNICA

DIRECTOR DE TESIS: **Mtra. Yolanda Flores Cabrera**

ASESOR DE TESIS: **Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara**

MÉXICO, D.F. 25 2013

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO	4
4. QUÉ ES UNA CEPA.....	5
5. FUNCIÓN DE UN CEPARIO.....	5
6. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS	6
6.1 Conservación a corto plazo (15-20 días)	7
6.1.1 Cultivos profundos en Agar.	7
6.2 Conservación a mediano plazo (2-5 años).	8
6.2.1 Tierra fértil estéril.....	8
6.2.2 Deseccación en papel de filtro.	8
6.2.3 Deseccación en bolitas de alginato.....	9
6.3 Conservación a largo plazo (más de 10 años)	9
6.3.1 Mantenimiento de cultivos por congelamiento.....	9
6.3.2 Mantenimiento de cultivos por liofilización o Freeze-Drying	12
6.3.3 Tipos de liofilizadores.	13
6.3.3.1 Liofilizador con centrifugación.	13
6.3.3.2 Liofilizador con estantes.	13

6.4 Crioinjuria-----	13
7. MÉTODO DE SORDELLI. -----	15
7.1 Modificación del método de Sordelli.-----	15
8. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS.-----	16
8.1 <i>Staphylococcus aureus</i> -----	16
8.2 <i>Enterococcus faecalis</i> -----	17
8.3 <i>Escherichia coli</i> .-----	18
8.4 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .-----	19
9. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA.	
9.1 Prueba de Catalasa y Peroxidasa -----	20
9.2 Prueba de Coagulasa -----	21
9.2.1 Coagulasa ligada. -----	21
9.2.2 Coagulasa libre.-----	22
9.3 Fermentación de Hidratos de Carbono.-----	22
9.4 Sulfuro-Indol-Motilidad. -----	23
9.5 Agar Verde Brillante. -----	24
9.6 Agar Casman. -----	25
10. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	26

11. OBJETIVOS-----	26
11.1 Objetivo General -----	26
11.2 Objetivo Especifico -----	26
12. HIPÓTESIS-----	27
13. DISEÑO EXPERIMENTAL-----	27
14. MATERIAL-----	28
15. MÉTODO -----	30
15.1 Reconstitución de las cepas de referencia ATCC -----	30
15.2 Implementación del método de conservación.-----	31
16. RESULTADOS -----	39
17. ANÁLISIS DE RESULTADOS -----	47
18. CONCLUSIONES -----	51
19. REFERENCIAS -----	52
20. ANEXO I -----	56

1. RESUMEN

La creciente demanda de cepas ATCC en procesos biotecnológicos, para el control de calidad o para la calibración de equipos de identificación microbiológica ha originado la necesidad de implementar métodos de conservación de microorganismos que aseguren el mantenimiento de sus características bioquímicas, actualmente el empleo de agentes crioprotectores tales como leche descremada, ácido ascórbico, dextrosa y carbón activado en las técnicas de conservación han sido de gran ayuda para el área clínica y para el sector industrial puesto que estos agentes protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas como la deshidratación o durante el proceso de la congelación, la elección del método de conservación dependerá del tipo de microorganismo que se pretende conservar, del periodo de conservación que se requiere y de los recursos con los que cuente el laboratorio. En el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (U.M.I.E.Z) de la F.E.S. Zaragoza se utilizan cepas bacterianas para el desarrollo de micro-técnicas; actualmente en el laboratorio no se cuenta con algún método de conservación, por lo que el propósito de este proyecto fue implementar un método acorde a las necesidades del laboratorio, como resultado del proyecto se logro implementar un micro-método utilizando como agente crioprotector leche descremada capaz mantener la viabilidad y las características bioquímicas y morfológicas, de *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 durante 90 días a una temperatura de conservación de -20° C, implementar este método de conservación a distintas cepas podrá reducir costos y espacios de almacenamiento.

2. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos los microorganismos han sido empleados como materiales esenciales de trabajo en la obtención de medicamentos de interés farmacéutico (antibióticos, vitaminas aminoácidos y proteínas), elaboración de alimentos (pan, queso, leche, bebidas y licores) y fabricación de disolventes y reactivos, su capacidad de disolver y transformar en sales los minerales de hierro o de níquel, la producción de ácido acrílico para conseguir plásticos sin necesidad de recurrir al petróleo entre otras aplicaciones ²⁰.

En el área clínica algunos de los organismos más estudiados son las bacterias ácido-lácticas, sobre todo *Lactobacillus spp* y *Bifidobacterium spp.*, consideradas seguras para uso humano por sus efectos benéficos en la salud que incluyen el tratamiento y la prevención de la diarrea por *rotavirus* en niños y reducción de la diarrea asociada con el uso de antibióticos, diarrea del viajero, vaginitis, infecciones urinarias, alergia a los alimentos, reacciones atópicas en niños y pueden mejorar la intolerancia a la lactosa. Los microorganismos también tienen uso en la evaluación de la calidad de los medios de cultivo, en la realización de controles de calidad interno durante la ejecución de ensayos, en la realización de controles de calidad de los reactivos (coloraciones y desempeño) y equipos automatizados, como pruebas confirmatorias y validación de métodos microbiológicos (pruebas de sensibilidad) ²².

Es por estas razones que el creciente uso de estos materiales biológicos han aumentado la necesidad de mantener los cultivos microbianos de manera que las propiedades que los hacen importantes como la bioquímica y la morfología microscópica y macroscópica permanezcan estables. La preservación de cepas microbianas no es tarea fácil y debe garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad de los cultivos, características que coinciden con los objetivos de un buen método de conservación a corto (resiembra periódica), mediano (esferas de alginato) y largo plazo (congelación) ^{1-3,22}.

En el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la UMIEZ F.E.S. Zaragoza actualmente no se cuenta con un método de conservación de cepas bacterianas que garantice la viabilidad y estabilidad bioquímica de sus cepas sin que tengan pérdidas mayores a un 30%, por lo que el propósito de esta investigación es probar la viabilidad de las cepas en estudio que el método de Sordelli pueda ofrecer y que mantenga las características bioquímicas originales de las cepas ATCC, y con los resultados obtenidos poder implementar un micrométodo de conservación en el Laboratorio.

3. MARCO TEÓRICO

La microbiología es la ciencia que se encarga del estudio de los microorganismos; un grupo grande y diverso de microorganismos microscópicos que viven en forma de células aisladas o grupos de células, también comprende a los virus que son microscópicos pero no son células. Los microorganismos influyen extensamente en la vida y constitución tanto física como química de nuestro planeta, son los encargados de los ciclos de los elementos químicos dispensables para la vida, incluidos carbono, nitrógeno, azufre, hidrógeno y oxígeno; los microorganismos realizan más fotosíntesis que las plantas verdes además los seres humanos tienen una relación estrecha con los microorganismos; más de 90% de las células del cuerpo corresponden a microorganismos ²⁸.

En este trabajo se discutirá la forma en que los microorganismos pueden ser preservados correctamente para ser posteriormente estudiados con detenimiento. Algunos de los avances de mayor importancia en el campo de la microbiología hacen referencia al conocimiento, conservación y uso de la diversidad microbiana ya que contribuyen al desarrollo de la microbiología clínica ²².

Por lo que la elección de la técnica más adecuada para conservar cultivos microbianos con frecuencia resulta difícil, pues deben tomarse en consideración los criterios de viabilidad y pureza de las cepas, cambios poblacionales y genéticos, número y valor de los cultivos, costo, suministro y transporte de cepas, así como, la frecuencia del uso de los cultivos ^{2,4}.

El método de conservación que se elija debe garantizar la supervivencia de al menos el 70% de las células por un período considerable de tiempo, de forma tal que la población sobreviviente se asemeje a la original tanto como sea posible, conserve las propiedades de importancia de los cultivos y minimice la ocurrencia de las alteraciones genéticas. De igual manera debe reducir al mínimo el riesgo de contaminación y permitir que la pureza del cultivo permanezca inalterable ^{20,22}.

Además de la estabilidad y viabilidad de las cepas es importante considerar el número de resiembras realizadas a cada una de ellas (hasta 4 resiembras como máximo), el periodo durante el cual se usara la cepa, la manipulación y el control periódico de las cepas, el espacio de almacenamiento disponible, para ser empleadas como materiales de referencia en el aseguramiento de la calidad microbiológica.

4. ¿PERO QUÉ ES UNA CEPA?

Un cultivo puro que proviene de un progenitor determinado. En microbiología se aplica el aislamiento de un microorganismo de un medio natural determinado. Ejemplo: *Staphylococcus epidermidis* aislado de la piel de una persona ²¹. Para su identificación se pueden emplear técnicas genotípicas y bioquímicas, todo lo anterior no hubiera sido posible sin la existencia de bibliotecas de microorganismos también conocidos como cepario ¹⁴.

5. FUNCIÓN DE UN CEPARIO

Un cepario es una colección de especies de microorganismos que se mantienen en el laboratorio, por diversos métodos de conservación, durante un tiempo determinado ²¹. En la industria farmacéutica algunos microorganismos son seleccionados de ceparios y utilizados para la producción de algún metabolito importante, el conocimiento, conservación y uso de la diversidad microbiana contribuyen al desarrollo de la microbiología clínica la cual se encarga del estudio de microorganismos patógenos para el ser humano, por lo que para conformar un cepario es necesario conservarlas por distintas técnicas que ayuden a prevenir algún posible cambio metabólico o genético manteniendo así las características de cada cepa ^{14,15}.

6. CONSERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Las bacterias sostienen la vida de nuestro planeta y aunque sólo se conoce alrededor del 1% de su diversidad muchas de ellas pueden resultar benéficas para ser utilizadas con fines biotecnológicos, agrícolas, biomédicos, ecológicos y de biorremediación ^{2,4}. Otras bacterias degradan compuestos tóxicos para los seres humanos y el medio ambiente muchas de ellas producen compuestos antimicrobianos que pueden usarse en el tratamiento de diversas enfermedades y/o productos importantes para la industria ²².

Debido a las características tan versátiles de metabolismo que presentan las bacterias, los investigadores han estado muy interesados en aislar nuevas especies bacterianas y descubrir otras potencialidades que puedan ser aplicadas para el beneficio humano. Las bacterias se originaron aproximadamente hace 2.5 billones de años y se considera que albergan características genéticas que han evolucionado desde entonces y que podemos utilizarlas para nuestro beneficio.

Para estudiar y explotar esas potencialidades, es conveniente resguardar a las bacterias en bancos, conservando sus características y viabilidad.

En la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (WFCC, por sus siglas en inglés) se hallan variadas técnicas disponibles para la conservación de microorganismos, por lo que debe considerarse la guía "*Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos*" publicada en 2010 apartado 7 de sus guías generales ²⁰, en la que establece que por seguridad y para minimizar la probabilidad de pérdida de las cepas, cada una debe ser mantenida por al menos dos procedimientos diferentes que brinden seguridad y reduzcan los riesgos de pérdida durante el almacenamiento ¹⁰. En general, existen tres categorías en las que se agrupan los métodos de conservación dependiendo del tiempo en que permanecen viables las células conservadas, a corto, mediano y largo plazo.

6.1 CONSERVACIÓN A CORTO PLAZO (15-20 DIAS):

La resiembra periódica es una técnica que permite la supervivencia de los cultivos en cortos períodos de tiempo, por eso se reconoce como un método de conservación a corto plazo ^{2,9}. Se basa en transferir el cultivo del medio seco a uno fresco proporcionándole las condiciones óptimas de crecimiento, lo que condiciona el elevado riesgo de contaminación y variabilidad de las características de las cepas, las cuales constituyen sus principales desventajas. El método de resiembra en serie en tubos inclinados y en medio líquido en refrigeración tiene una duración de 15 a 20 días de almacenamiento ¹¹.

El mantenimiento de cepas bajo una capa de aceite mineral o una tapa de cera son técnicas simples y efectivas para prolongar la conservación de muchos organismos y consiste en cubrir completamente el cultivo después de su desarrollo en medio sólido, con una capa de aceite mineral como almerol, nugol ó vaselina estéril y deben ser protegidos con capuchón metálico o de papel parafina.

Los cultivos en esta forma se pueden conservar a temperatura ambiente o aún mejor en refrigeración por períodos de varios años. Algunos autores sostienen que en estas condiciones los microorganismos pueden continuar reproduciéndose, con posibilidades de aparición de mutantes y que se reflejara en la viabilidad de las cepas, sin embargo se acepta que estas alteraciones no se observan hasta los tres años de mantenimiento ¹⁵. Otro método:

6.1.1 Cultivos profundos en Agar.

Este es un método adecuado para el mantenimiento de microorganismos anaerobios los cuales han sido aislados de suelo, con un asa bacteriológica recta esterilizada se toma la cantidad de inóculo, se introduce en el fondo del medio solido de forma vertical y se retira en la misma dirección por donde se introdujo, si el cultivo se hace en medio liquido con un asa bacteriológica curva esterilizada se toma la cantidad de inóculo, se introduce en el centro del medio liquido, agitándose sin tocar las paredes del tubo, las condiciones de incubación y almacenamiento dependerán del tipo de microorganismo ^{11,15}.

6.2 CONSERVACIÓN A MEDIANO PLAZO (Dos-Cinco Años):

A mediano plazo, es el término que agrupa las técnicas con las que se logra mantener la viabilidad de los cultivos entre dos y cinco años. Se destacan en este grupo la desecación en diferentes soportes (arena estéril, sílica gel, perlas de vidrio, esferas de plástico o papel filtro) donde la paralización del crecimiento se produce por eliminación del agua disponible ^{1-3,9}, así como el almacenamiento en suelo estéril, parafina líquida y la suspensión en agua estéril (destilada o de mar), métodos bien documentados en especial para los hongos ¹¹.

Para este tipo de conservación se utiliza un soporte sólido para atenuar el metabolismo ¹¹.

6.2.1 Tierra fértil estéril.

El microorganismo se añade a el sustrato (sílica gel, arena etc), que protegerán al microorganismo de la desecación, se coloca en un recipiente al vacío, esto es perfecto para el microorganismo que esporula (*Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*) ^{1,2}.

6.2.2 Desecación en papel de filtro.

Se utiliza un papel bastante absorbente (Whatmann n° 3) que se impregna con una solución muy densa de células y se deja secar al aire (en condiciones estériles). También es posible desecarlos por el procedimiento que se llama desecación líquida (L-Dry) porque se utiliza para ello el liofilizador, pero sin que haya habido congelación previa de las células. El vacío producido por el liofilizador deseca las células, pero hay que evitar que un vacío excesivo provoque evaporación brusca con ebullición o que la temperatura disminuya demasiado, ocasionando la congelación incontrolada de las células ¹⁻³.

6.2.3 Deseccación en bolitas de alginato.

Éste es un procedimiento bastante eficaz. Las células se encuentran en una matriz de alginato y la eliminación del agua se hace por tratamiento con soluciones hipertónicas sucesivas y posterior desecación al aire hasta que se pierde un 70% de su contenido en agua. Estas bolitas de alginato se pueden conservar en tubos cerrados herméticamente y a temperaturas de entre 4° C y 18° C, pudiéndose guardar incluso a – 80° C debido al bajo contenido en agua de las células y la protección que suministra el soporte de alginato. Este es un método que se está utilizando incluso para la conservación de algas y células vegetales ^{1-3,6}.

6.3 CONSERVACIÓN A LARGO PLAZO (más de 10años):

En esta categoría se ubican los métodos de congelación (a –70° C y –196° C) y la liofilización ¹⁻⁴, como técnicas que minimizan al máximo el riesgo de cambio genético en las células y las mantienen viables por 10 años o más, ventajas que han condicionado su extensa utilización para conservar disímiles materiales biológicos (cultivos de hongos, bacterias, levaduras, algas, suero, células sanguíneas, entre otros) y que sean reconocidas como técnicas de elección.

Son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto, así se garantiza al máximo la estabilidad genética, por evitarse la aparición de generaciones sucesivas aun así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en si mismo ^{11,12}.

6.3.1 Mantenimiento de cultivos por congelamiento.

La crioconservación consiste en la conservación de los microorganismos a temperaturas inferiores a cero grados centígrados en suspensión en un liquido y con un agente crioprotector. Se basa en la paralización del metabolismo celular por la disminución del agua disponible ^{9 11,12}.

En muchas ocasiones es más conveniente mantener un cultivo usando técnicas menos convencionales, de tal forma que una de las empleadas es por congelamiento

del cultivo, este método tiene el inconveniente de que la velocidad de muerte del microorganismo será mayor cuando menos baja sea la temperatura de mantenimiento, además también durante el proceso de congelamiento algunas células mueren. En la conservación de cultivos por este procedimiento, se requiere equipo capaz de mantener temperaturas de enfriamiento bastante bajas, esto puede lograrse con el uso de nitrógeno líquido ^{11, 12}.

Este tipo de conservación es utilizada en la práctica común, para trabajo continuo, ya que mantiene un ritmo elevado de metabolismo. No se recomienda utilizar este tipo de conservación para trabajos de periodos largos ya que provoca mucho estrés al microorganismo y la reactivación es muy rápida ^{2, 3, 11}.

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

1. *Edad de las células:* En la mayoría de los casos conviene utilizar células maduras del inicio de la fase estacionaria de la curva de crecimiento, pero cuando se trate de organismos que presenten en su ciclo vital algún estado que les prepare para la resistencia a condiciones adversas, es preferible alcanzar este estado. Esto sucede en el caso de microorganismos que esporulan, en algunos pleomórficos e incluso en algunos más sencillos.
2. *Velocidad en la congelación y descongelación:* Aunque hay programas de congelación bien estandarizados para determinados casos o circunstancias, en general es mejor que las variaciones de la temperatura sean rápidas, tanto para la congelación como para la descongelación, por lo que para descongelar conviene poner las células a 37° C.
3. *Temperatura de almacenamiento:* Debe ser lo más baja posible. Lo mejor es guardar tubos cerrados o sellados, que contengan las células microbianas, sumergidos en nitrógeno líquido, que tiene una temperatura de -195° C, o bien en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, con una temperatura de -140° C.

En el mercado existen variados tipos de armarios congeladores, de los cuales los más aconsejables son los que alcanzan temperaturas por debajo de -70° C. Aquellos que sólo alcanzan temperaturas entre -20° C y -40° C, como ocurre con la mayoría, no son aconsejables, entre otras cosas porque debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja. El daño que se produce en las células es debido a que a estas temperaturas hay frecuentes congelaciones y descongelaciones. Si se añade un crioprotector no iónico, como por ejemplo glicerol, se reduce la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración iónica.

Para la conservación en armarios congeladores, las células se almacenan en criotubos (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación que cierran herméticamente), preparando lotes de varios tubos para cada cepa a conservar y utilizando en su totalidad un tubo para cada ocasión. De esta manera se evita que las cepas se congelen y se descongelen varias veces. Esto también se puede evitar empleando tubos con criobolas (bolas de tipo abalorio que se impregnan con la solución celular a congelar), ya que para tomar una muestra basta con emplear una o varias bolitas sin necesidad de descongelar el resto. Este método no se debe emplear para la conservación de microorganismos anaerobios, como por ejemplo el género bacteriano *Clostridium*, ya que al estar las células en una superficie hay un mayor contacto con el oxígeno y puede afectarse la viabilidad.

4. *Empleo de agentes crioprotectores*: Estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores, pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15 al 20%. También se pueden utilizar el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar

11,20

6.3.2 Mantenimiento de cultivos por liofilización ó Freeze - Drying

Es un método de conservación a largo plazo y se basa en la paralización del metabolismo celular por falta de agua: congelación y sublimación ^{3,11}. Con ello la estabilidad genética es alta, pero a veces no tanto como en la congelación, porque la liofilización se consigue por sublimación del hielo de las células. Por lo tanto, primero tenemos que congelar el agua libre de las células y después eliminarla mediante el vacío, sin que haya necesidad de subir la temperatura, lo que acabaría afectando a la viabilidad del microorganismo. Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores, de los que hay muchos modelos en el mercado.

Las células microbianas así conservadas se someten a un tratamiento más complejo que en el caso de la congelación, pues la liofilización se hace en dos etapas y se añade la sublimación del agua a la congelación previa. Sin embargo, este es un método muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas, pues una vez conseguidos los líofilos pueden almacenarse a temperatura ambiente (18° C, -20° C), con lo cual su envío es muy cómodo. Este proceso puede durar de 15 a 20 años o más de almacenamiento.

La liofilización es apropiada para la conservación de la mayoría de las bacterias, encontrándose que las Gram positivas sobreviven mejor que las Gram negativas cuando se liofilizan y mantiene en condiciones similares. También se emplea en la conservación de esporas, actinomicetos, muchos hongos y levaduras ⁶.

La ventaja es que la mayoría de los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad ^{6,11}. Respecto a los crioprotectores, ya vimos que se pueden utilizar varios dependiendo del tipo de microorganismo, pero para liofilizar no se debe utilizar glicerol, debido a su elevado punto de evaporación y a su higroscopicidad, que provoca que los líofilos queden muy viscosos. Tampoco es conveniente utilizar el dimetilsulfóxido, porque es algo tóxico, y al concentrarse por la evaporación del agua puede dañar las células microbianas. Por lo tanto, para la liofilización se recomiendan como crioprotectores el inositol para la mayoría de las bacterias y la leche descremada para hongos y actinomicetos, pero para algunos microorganismos

pueden ser más convenientes otros crioprotectores, como por ejemplo el glutámico-glutamato para las bacterias lácticas, mezclas de glucosa con caldo hígado o *choppedmeat* (sin carne) para bacterias anaerobias, etc ¹¹.

6.3.3 TIPOS DE LIOFILIZADORES

6.3.3.1 Liofilizador con centrifugación.

Se utilizan ampollas de vidrio taponadas, la suspensión se centrifuga durante la 1ª fase de la desecación, se estrechan las ampollas y después de conectarlas a una bomba de vacío, se sellan.

Ventajas: Se utiliza la centrifugación para que el proceso de congelación sea suave y de forma homogénea.

6.3.3.2 Liofilizador con estantes.

La suspensión se prepara en viales y es pre-congelada a temperaturas muy bajas antes de aplicar el vacío. La segunda etapa de la desecación se realiza también en el liofilizador ⁶.

6.4 Crioinjuria.

Es el proceso de congelamiento y descongelamiento que produce cambios en las células y que pueden resultar letales.

Los procesos perjudiciales son:

- Formación de cristales de hielo
- Exosmósis
- Aumento de la solubilidad de gases
- Deshidratación
- Aumento de la concentración de osmolitos
- Disminución del pH

- Alteraciones de la actividad enzimática
- Acumulación de metabolitos
- Incremento del contacto entre moléculas
- Ruptura de puentes de H
- Distorsión de macromoléculas
- Solidificación
- Pérdida de la integridad de membranas
- Ruptura de emulsiones, etc

La formación de hielo intracelular o extracelular es quizás el evento más crítico de la crioinjuria ². Los nuevos factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son:

1. *Tipo de microorganismo*: Hay algunos microorganismos que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior. Algunos hongos filamentosos, especialmente los no esporulados, no se pueden guardar liofilizados y hay que recurrir a otros métodos.
2. *Concentración celular*: Lo mejor es liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de 10^8 - 10^9 células/mL en el caso de las bacterias y algo inferior en el caso de hongos filamentosos y levaduras.
3. *Temperatura durante la sublimación*: Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de -50°C .
4. *Grado de deshidratación alcanzado*: Debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial.
5. *Atmósfera de oxígeno en el tubo*: Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células.
6. *Condiciones de almacenamiento*: La temperatura debe ser constante, preferentemente a 18°C y sin bajar de los 0°C . Los liófilos se deben guardar en la oscuridad ^{2, 6, 11}.

7. MÉTODO DE SORDELLI

Es un método que fue descrito en el V congreso internacional de Microbiología celebrado en Rio de Janeiro, SORIANO (1950) en el que se propuso individualizarlo con el nombre de método de Sordelli, es un procedimiento ideado para conservar cepas microbianas por desecación rápida al vacío, que se disponen con un asa sobre la pared de un tubo pequeño estéril, este tubo pequeño ya tapado a su vez se coloca en el interior de un tubo de ensayo con sílica gel o Cloruro de calcio (CaCl_2) indicador de humedad. Una vez que el tubo pequeño se encuentra dentro del tubo de ensayo este se sella a la flama en forma de ampolleta como se muestra en la Figura 1. Y se almacena a temperatura ambiente ^{1, 13, 14, 23}.

7.1 MODIFICACIÓN DEL MÉTODO DE SORDELLI.

Algunas de las razones que llevaron a la modificación del método fueron la dificultad para adquirir los materiales necesarios para su aplicación, el temor a la disminución de vacío al cabo de algunos años. Prácticamente la única modificación propuesta reside en que cada tubo es utilizado una vez y tiene como ventaja el bajo costo del material para su ejecución. En la técnica modificada el microorganismo se suspende en una gota de coloide protector (suero vacuno, albumina o leche descremada) estéril. Luego se procede como en el método de *Sordelli*, esta técnica permite la conservación de hongos filamentosos y bacterias (más de 10 años) ^{1, 13, 14, 23}.

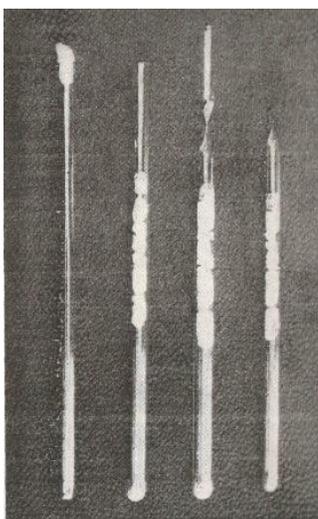


Figura 1. De Izquierda a Derecha: Tubo estéril listo para comenzar las distintas operaciones que comprende el método; tubo conteniendo el cultivo y los elementos descriptivos en el texto; tubo estirado y listo para practicar el vacío; tubo sellado a la flama después de haber practicado el vacío.

8. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS

8.1 *Staphylococcus aureus*

La familia *Staphylococcaceae* comprende cuatro géneros, de ellos el más importante clínicamente es el género *Staphylococcus*. Los miembros de este género son Gram positivos, anaerobios facultativos, inmóviles, que habitualmente forman agrupaciones irregulares o racimos de uva, son catalasa positivos, oxidasa negativos, fermentan la glucosa y poseen ácido teicóico en sus paredes celulares. Los estafilococos residen normalmente en la piel, las glándulas cutáneas y las mucosas de animales de sangre caliente ^{11,14}.

Staphylococcus aureus es el estafilococo patógeno más importante en el ser humano y forma forúnculos, abscesos, infecciones de heridas, neumonía, síndrome de shock tóxico y otras enfermedades, reconocidos por primera vez por Koch en 1878, descritos y cultivados por Pasteur en 1880, aunque tienden a formar racimos también se encuentran aislados, en parejas y en cadenas cortas; la estructura de su pared Gram positiva es típica, carecen de flagelos, algunas especies pueden formar capsulas en condiciones especiales ^{11,17}. El género *Staphylococcus* comprende actualmente 32 especies y 15 subespecies; las especies de mayor importancia son: *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*. Desde el punto de vista de la medicina *Staphylococcus aureus* es la bacteria más importante de este género que a diferencia de las otras especies, produce coagulasa (que hace que la fibrina se aglomere y forme un coagulo). Las otras especies son coagulasa negativas, la coagulasa es una proteína capaz de coagular al plasma citratado u oxalatado, con factores presentes en el suero. Es el agente etiológico de gran número de infecciones en el hombre. Pueden producir procesos inflamatorios, supurativos en casi cualquier tejido, los cuales pueden ser muy leves hasta de elevada gravedad y culminar en la muerte del paciente. Además son fabricantes de toxinas que provocan cuadros clínicos de muy diversas manifestaciones. Otro aspecto muy importante es que con gran facilidad pueden desarrollar resistencia a gran variedad de antimicrobianos, lo que significa que la colonización en el hombre es un gran peligro. Cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilcilina (SARM), y otros *S. aureus* resistentes a la vancomicina, se encuentran entre los patógenos más

* | García López Edgar

amenazadores resistentes a antibióticos conocidos. La vancomicina se considera el fármaco de último recurso y las infecciones producidas por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la vancomicina por lo general no pueden tratarse con terapia de antibióticos ¹⁷.

8.2 *Enterococcus faecalis*

Enterococcaceae (*Enterococcus*) y *Streptococcaceae* (*Streptococcus*, *Lactococcus*) son familias importantes de cocos Gram positivos, quimioheterótrofos, mesófilos y no esporulados. En la práctica se distinguen con base en propiedades fenotípicas como sus relaciones con el oxígeno, la organización celular, la presencia de catalasa y citocromos y la estructura del peptidoglucano. Los enterococos crecen en parejas o cadenas cuando se cultivan en medio líquido, no forman esporas y habitualmente son inmóviles. Todos ellos fermentan azúcares produciendo ácido láctico, pero no gas, como producto fundamental es decir, realizan una fermentación homoláctica. Algunas especies son anaerobias en vez de facultativas ^{11,14}.

Los enterococos como *Enterococcus faecalis* son habitantes normales del tracto gastrointestinal de los seres humanos y de la mayoría de los animales. *Enterococcus faecalis* es un patógeno oportunista que puede producir infecciones urinarias y endocarditis.

A diferencia de los estreptococos, los enterococos crecen en cloruro sódico al 6.5% son agentes muy importantes en la transferencia de genes de resistencia a los antibióticos, tienen una temperatura adecuada de crecimiento de 45° C, puede tener una hemólisis α , β ó negativa ¹⁷.

Las especies de mayor importancia: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum*.

8.3 *Escherichia coli*

Las bacterias del género *E. coli* son Gram negativas, tienen forma de barra y pertenecen a la familia Enterobacteria, esta bacteria es un habitante común de los intestinos de todos los animales, incluyendo el intestino grueso de los humanos. *Escherichia coli* (*E. coli*) es quizás el organismo procarionte más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria unicelular que se encuentra generalmente en los intestinos animales y por ende en las aguas negras. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Además produce vitaminas B y K. Todos los serotipos se asocian con virulencia ¹⁷.

Una tipificación incluye la determinación de los antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y de fimbria (F). Por lo que se les ha clasificado en 5 categorías:

- *E. coli* Enterotoxigénica (ECET)
- *E. coli* Enteropatogénica (ECEP)
- *E. coli* Enteroinvasiva (ECEI)
- *E. coli* Enterohemorrágica (ECEH)
- *E. coli* Enteroadherente ò Enteroagregativa (ECEA)

Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram negativo), es anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), con dimensiones de 0.5 x 1.9 a 3.0 micras, no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, así como, positiva al indol, descarboxilación de lisina, fermentación de manitol y gas a partir de la glucosa, citrato negativa ¹⁴.

Normalmente cumple una función importante en el cuerpo, suprimiendo el crecimiento de especies dañinas de bacterias así como también sintetizando cantidades apreciables de vitaminas, además posee apéndices filamentosos de naturaleza protéica frecuentemente portadoras de adhesinas, que presentan la propiedad de combinarse con receptores de naturaleza polisacarida localizados en la superficie de las células epiteliales llamados pilis o fimbrias, muchas cepas producen una pequeña microcapsula, muy pocas producen macrocapsulas ¹⁴.

Son pocas las cepas de *E. coli* capaces de causar enfermedades a los humanos a través de diferentes mecanismos. Entre ellas están las cepas Enteroinvasivas (EIEC) responsables de una forma de la disentería bacilar. No obstante, es desconocido aún el tipo de alimentos que pueden hospedar a estas bacterias patogénicas ¹¹.

8.4 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis es una de 33 especies conocidas pertenecientes al género *Staphylococcus*. Es parte de la flora comensal de la piel y en consecuencia se considera parte de la flora humana. Aunque el *S. epidermidis* no suele ser patógeno, los pacientes con sistemas inmunes comprometidos son a menudo blanco de desarrollar una infección.

Estas infecciones pueden ser tanto nosocomiales o adquiridas en la comunidad, pero que representan una amenaza mayor para los pacientes del hospital. Este fenómeno puede ser el resultado de un uso continuo de antibióticos y desinfectantes en los hospitales, lo que lleva a la presión evolutiva hacia cepas más virulentas y resistentes del organismo ¹¹. *S. epidermidis* es también una preocupación importante para las personas con catéteres u otros implantes quirúrgicos, ya que se sabe que causa las biopelículas que crecen en estos dispositivos de plástico y es un importante factor de virulencia de *S. epidermidis*. Una causa probable es que se une a las proteínas de superficie sangre y proteínas de matriz extracelular.

Como se mencionó anteriormente, *S. epidermidis* causa biopelículas que crecen en los dispositivos de plástico que se colocan dentro del cuerpo esto ocurre más comúnmente en los catéteres intravenosos y prótesis médicas. La infección también puede ocurrir en pacientes sometidos a diálisis o a cualquier persona con un dispositivo plástico implantado que puede haber sido contaminado. Otra enfermedad que causa es la endocarditis en pacientes con válvulas cardíacas¹⁷.

Es un microorganismo muy resistente, que consiste en cocos Gram positivos no móviles que crece en colonias de aproximadamente 1.2 milímetros de diámetro y no hemolíticas en agar sangre.

* |García López Edgar

Se clasifica como catalasa positiva, coagulasa negativa, anaerobia facultativa que puede crecer mediante la respiración aeróbica o por fermentación de hidratos de carbono como la glucosa, sacarosa, en presencia de lactosa también produce gas, forma productos ácidos finales, es positiva para la producción de ureasa y es sensible a la novobiocina proporcionando una prueba importante para distinguirlo de *Staphylococcus saprophyticus*, que es resistente a la novobiocina ¹⁴.

La cápsula del organismo, conocida como polisacárido de adhesión intercelular (PIA), se compone de polisacárido sulfatado. Esto permite que otras se unan a la biopelícula ya existente, creando una biopelícula multicapa. Tales biopelículas disminuyen la actividad metabólica de las bacterias dentro de ellas. Esta disminución del metabolismo, en combinación con el deterioro de la difusión de los antibióticos, hace que sea difícil para los antibióticos para combatir con eficacia este tipo de infección.

9. PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA.

9.1 PRUEBA DE CATALASA Y PEROXIDASA

Principio: Probar la presencia de la catalasa o peroxidasa o de ambas.

Bioquímica: Cuando las flavoproteínas reducidas o las proteínas con azufre y hierro reducidas se unen con el oxígeno y las oxidasas presentes en la cadena respiratoria de todas las bacterias, se forman dos compuestos tóxicos; el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical superóxido (SOD) O_2^- ³².

El H_2O_2 es un producto final oxidativo de la degradación aeróbica de los azúcares. La flavoproteína reducida reacciona de manera directa con el oxígeno gaseoso por vía de la reducción de los electrones para formar H_2O_2 .

La catalasa y la Superóxido Dismutasa (SOD) están presentes en la mayoría de las bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas (aerotolerantes) que contienen citocromos. Las excepciones principales son a las especies de *Streptococcus*, que carecen de catalasa. Los anaeróbicos obligados (estrictos) carecen de ambas enzimas; la mayoría de las bacterias anaeróbicas (p. ej. Especies de *Clostridium*) poseen peroxidasa en lugar de catalasa ²⁴.

9.2 PRUEBA DE COAGULASA

Principio: Probar las capacidad de un microorganismo de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa (estafilocagulasa).

Bioquímica: La prueba de la coagulasa se utiliza de manera específica para diferenciar especies dentro del género *Staphylococcus*, la estafilocagulasa (coagulasa), la enzima producida por *S. aureus*, es relativamente estable al calor resiste temperaturas de hasta 60° C durante 30 minutos. Esta proteína es excretada al medio extracelular por las cepas humanas de *S. aureus* y se inactiva con facilidad por las enzimas proteolíticas (proteasas). Esta enzima actúa sobre algunos constituyentes del genero para producir un coagulo o trombo In vitro, la coagulasa aumenta la velocidad de coagulación del plasma lo que produce la formación de un coagulo de fibrina ²⁴.



9.2.1 Coagulasa ligada.

La coagulasa ligada se detecta por el procedimiento en portaobjeto, la prueba de agregación del plasma, no esta presente en los filtrados de cultivo sino que se encuentra en la superficie de las paredes celulares. La coagulasa ligada o factor de agregación (CF) es responsable de la absorción del fibrinógeno y lo altera de tal modo que precipita sobre los estafilococos y causa la agregación de estos, lo que produce la aglutinación rápida de las células.

El factor de agregación convierte el fibrinógeno en fibrina de manera directa, sin la participación de los factores del plasma y no es inhibido por los anticuerpos contra la coagulasa libre ²⁴.

9.2.2 Coagulasa libre.

La prueba de la coagulasa en tubo detecta ambas coagulasas, la libre y la ligada, siendo la única distinción entre ambas la antigénica. La coagulasa libre extracelular reacciona con sustancias en el plasma (factor del suero) que Dubos y Hirsch y Drummond y Tager denominaron factor de reacción de la coagulasa o CFR una sustancia termoestable similar a la trombina, el CFR es un activador o una molécula modificada derivada de la trombina la cual actúa con la coagulasa libre extracelular y reacciona con el CFR para formar un complejo coagulasa-CFR la cual es una sustancia similar pero no idéntica a la trombina, este complejo actúa de manera indirecta para convertir el fibrinógeno en fibrina durante la coagulación, en esta se liberan péptidos similares a partir de fibrinógeno y del complejo coagulasa-CFR, la diferencia principal es que el CFR que reacciona con la coagulasa no requiere iones calcio para formar un coagulo y es insensible a la heparina ²⁴.

9.3 PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

Principio: Determinar la capacidad de un microorganismo para fermentar (Degradar) un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal y producir ácido o ácido con gas visible.

Bioquímica: Los hidratos de carbono se clasifican en a) monosacáridos, aldehídos polihidroxilados o cetonas, b) polisacáridos u oligosacáridos, productos de condensación de dos o más monosacáridos (polímeros de monosacáridos); o c) alcoholes polihídricos y ciclitoles, productos de la reducción de monosacáridos. Un monosacárido o azúcar simple por lo común contiene entre 1 y 6 átomos de carbono.

Los polisacáridos, trisacáridos y disacáridos son demasiado complejos para penetrar en una célula bacteriana para su degradación. Si pueden ser metabolizados por una especie bacteriana particular, primero son catabolizados a monosacáridos menos complejos por enzimas exocelulares (permeasas) para que puedan ser incorporados al interior de la célula.

La fermentación es un proceso metabólico anaerobio de oxidación-reducción en el cual un sustrato orgánico actúa como el aceptor final de hidrógeno (aceptor de electrones) en lugar de oxígeno. En el proceso de fermentación bacteriana más común se producen productos finales como ácido láctico ²⁴.

9.4 PRUEBA DE SULFURO-INDOL-MOVILIDAD

Ácido sulfhídrico.

Principio: Determinar si se ha liberado enzimáticamente ácido sulfhídrico (H₂S) gaseoso a partir de los aminoácidos azufrados para producir una reacción coloreada visible, negra, en presencia de un sistema indicador de H₂S.

Bioquímica: La proteólisis de las proteínas produce aminoácidos individuales; ciertas bacterias heterotróficas pueden liberar enzimáticamente el azufre de los diversos aminoácidos azufrados (-SH) produciendo H₂S gaseoso.

Un microorganismo productor de H₂S cultivado en un medio orgánico como la peptona reduce el azufre por hidrogenación, produciendo H₂S gaseoso ^{24,39}.

Prueba de Indol.

Principio: Determinar la capacidad de un microorganismo para separar indol a partir de Triptófano

Bioquímica: El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol y ácido indolacético. Las diversas enzimas intracelulares involucradas se denominan

colectivamente Triptofanasa un término general utilizado para designar un sistema completo de enzimas que median la producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco por actividad hidrolítica sobre el sustrato triptófano. La prueba del indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el Indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehido (Reactivo de Kovacs) ^{24,39}.

Prueba de motilidad.

Principio: Permite determinar la capacidad o incapacidad de movimiento por parte de un microorganismo.

Bioquímica: Las bacterias son móviles por medio de flagelos que están presentes sobre todo entre los bacilos, sin embargo unas bacterias en formas de coco son móviles.

Las bacterias móviles pueden contener sólo un único flagelo o muchos flagelos y su ubicación varía según las especies bacterianas y las condiciones de cultivo en, algunas ocasiones las bacterias móviles producen variantes inmóviles que parecen estables y en raras oportunidades revierten a las formas móviles ^{24,39}.

9.5 AGAR VERDE BRILLANTE

Principio: Este medio es recomendado para ser utilizado en muestras clínicas y de alimentos. La alta selectividad de este medio permite el uso de inóculos moderados y pesados. El agar verde brillante es de mucho valor cuando se quiere investigar la presencia de especies de *Salmonella* diferentes a *S. typhi* y *S. paratyphi*. Este medio es utilizado en las pruebas de límites microbianos recomendadas en la USP, estas pruebas de límites microbianos son realizadas para asegurar que los productos farmacéuticos se encuentren dentro de los lineamientos establecidos.

Desarrollado por Kristensen, Lester y Jurgens en 1925 y modificado por Kauffmann. En el medio de cultivo, la pluripeptona y el extracto de levadura, constituyen la fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales.

La lactosa y la sacarosa son los hidratos de carbono fermentables, el rojo fenol es el indicador de pH, que vira al amarillo cuando hay producción de ácido a partir de la fermentación de azúcares, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el verde brillante actúa como agente selectivo que inhibe fundamentalmente el desarrollo de flora Gram positiva y de algunos microorganismos Gram negativos. El agar es el agente solidificante, este medio de cultivo tiene un valor excepcional cuando se investiga un gran número de muestras de heces o alimentos ya que tiene una alta capacidad de diferenciación de las colonias sospechosas ³⁶.

9.6 AGAR CASMAN.

Principio: Es un medio utilizado para el aislamiento de microorganismos exigentes.

La proteosa peptona n° 3, triptona y extracto de carne proporcionan nitrógeno, vitaminas y aminoácidos. La nicotinamida favorece el crecimiento de *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* impidiendo la liberación de la coenzima (factor V) por medio de nucleotidasas procedentes del enriquecimiento con sangre. La dextrosa se añade para favorecer el crecimiento de cocos patógenos.

El Cloruro sódico mantiene el balance osmótico en el medio, la función del almidón es asegurar que cualquier metabolito tóxico producido sea absorbido neutralizando la inhibición de beta-hemólisis por la glucosa y así favorecer el crecimiento de *Neisseria sp*, el agar bacteriológico es el agente gelificante ³⁷.

10. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La conservación de cepas bacterianas por distintos métodos, ha sido una forma efectiva y de gran ayuda para las industrias y laboratorios clínicos, para mantener sus cepas de referencia; algunos de los principales usos de estas cepas es para control de calidad microbiano de productos, procesos, equipos, medios de cultivo, reactivos, entre otros.

En el Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la UMIEZ F.E.S. Zaragoza se utilizan cepas bacterianas para el desarrollo de microtécnicas; actualmente en el Laboratorio no se cuenta con algún método de conservación, por lo que el propósito de este proyecto es desarrollar un método de conservación de cepas bacterianas acorde a las necesidades del laboratorio.

11. OBJETIVOS

11.1 General:

- Implementar un método de conservación de cepas bacterianas para el Laboratorio de Microbiología e Inmunología número 1 Planta Alta de la UMIEZ F.E.S Zaragoza.

11.2 Especifico:

- Modificar el método de Sordelli
- Desarrollar un método de conservación
- Evaluar la viabilidad de las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 en el tiempo; cero, 15, 30, 60 y 90 días y a tres temperaturas de conservación (-20 °C, 4°C y Temperatura ambiente).
- Determinar las características morfológicas y bioquímicas de las cepas bacterianas conservadas por el método desarrollado al inicio y al término del tiempo de conservación.

12. HIPÓTESIS

- El método propuesto es capaz de mantener la viabilidad de las cepas en un 70 a 80% conservando sus características morfológicas y bioquímicas después de un periodo de 90 días de conservación a tres diferentes temperaturas -20° C, 4° C y Temperatura ambiente.

13. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de estudio: Se realizara un estudio experimental y prospectivo

Población de estudio: Cepas ATCC

- *Staphylococcus aureus* ATCC29213
- *Enterococcus faecalis* ATCC29212
- *Escherichia coli* ATCC25922
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228.

Criterios de Inclusión: Cepas puras ATCC tipificadas y de Baja patogenicidad.

Criterios de exclusión: Cepas contaminadas, Cepas sin clave ATCC, Cepas de alto riesgo y patogenicidad.

Variables:

Dependiente: Cepas ATCC.

Independiente: Temperatura.

Crioprotector.

Tiempo de conservación.

14. MATERIAL

- Mechero Fisher
- Tubos de ensaye de 13x100 con tapón de rosca estériles. Pyrex
- Tubos de ensaye de 16x150 con tapón de rosca estériles. Pyrex
- Gradilla Metálica
- Pipetero Powerpette JENCONS
- Pipetas Graduadas de 10 mL
- Pipetas Graduadas de 5mL
- Cajas Petri estériles. Pyrex
- Placas de Agar Soya-Trypticaseina. MCD LAB
- Tubos de 16x150 con Agar inclinado Soya-Trypticaseina. MCD LAB
- Asa Bacteriológica
- Lápiz Punta Diamante
- Algodón
- Gasa
- Papel Kraft
- Tubos Capilares estériles O.D. 1.40-1.60mm vol. 80µL s/ heparina.LAUKA
- Pinzas de Disección
- Micropipeta.de 5-50 µL. BioHit Proline
- Puntas para micropipeta estériles. BioClean
- Criotubos estériles con radiación Gamma. Senna 6-732
- Marcador indeleble
- Matraz Erlenmeyer. Pyrex
- Celdas estériles para espectrofotómetro. Milton Roy Company
- Jeringa de 3 mL
- Agua destilada
- Probeta de 100mL. Pyrex
- Cinta Adhesiva (Maskin Tape)
- Vaso de precipitados de 250mL.Pyrex
- Portaobjetos

EQUIPO:

- Autoclave.
- Incubadora 37° C ± 2° C. SHEL LAB
- Microscopio electrónico. PRIMO STAR ZEISS
- Baño Metabólico 45° C. GCA/PRECISION CIRCULATING SYSTEM-253
- Balanza Digital. Explorer PRO
- Congelador -20° C. Tor Rey
- Refrigerador 4° C. MABE TWIST AIR
- Espectrofotómetro. THERMO SCIENTIFIC SPECTRONIC 20+
- Agitador Vortex-Genie 2 Scientific Industries

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Soya-Trypticaseina BD BBL
- Caldo Soya-Trypticaseina BD BBL
- Agar S.I.M.
- Agar Verde Brillante. BD BBL
- Agar Casman BD BBL
- Caldo rojo de fenol BD BBL

REACTIVOS

- Aceite mineral.OMNICHEM
- Solución Salina inyectable 0.9% Laboratorio PISA
- Colorantes de Gram. SIGMA
- Solución Alcohol-Yodo. Lymphoprep AXIS-SHIELD PoC. AS
- Hipoclorito de sodio. GREAT VALUE
- Leche descremada al 15% estéril. SVELTY
- Sacarosa
- Lactosa
- Glucosa
- Manitol
- Peróxido de Hidrogeno (H₂O₂)
- Reactivo de Kovac`s.

CEPAS:

- *Staphylococcus aureus* ATCC29213
- *Enterococcus faecalis* ATCC29212
- *Escherichia coli* ATCC25922
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228

15. MÉTODO

15.1 Reconstitución de las Cepas de Referencia ATCC.

1. Realizar una resiembra por agotamiento por duplicado (en caja y en tubo inclinado) de las 4 cepas de referencia ATCC en Agar Soya-Trypticaseina BD BBL, una cepa para trabajo y la otra cepa de reserva para cada bacteria. Incubar a 37° C por 24hs.

Nota: El número de repiques (resiembra) partir de la cepa de referencia a de ser limitado, aceptándose hasta 4 pases como máximo a partir de la cepa o semilla original de referencia. De acuerdo a lo descrito en el Boletín de información técnica TIB.081 "Recommended Growth Requirements ATCC."

2. Pasadas las 24 hs de incubación realizar lectura de morfología colonial de cada una y realizar morfología microscópica con la técnica de tinción de Gram para identificar a cada uno de los microorganismos en cuestión.
Almacenar las cepas de reserva y las cepas de referencia entre 2-8° C hasta su uso.

15.2 Implementación del Método de Conservación.

I. Ajuste de la carga de Microorganismos mediante el Nefelómetro de Mc Farland.

Para cada bacteria:

1. Medir 3 mL de Solución inyectable estéril (0.9% Laboratorio PISA) con una Jeringa y pasarlos al tubo inclinado de Agar Soya-Trypticaseína BD BBL inoculado con cada una de las cepas de estudio y agitar hasta obtener una suspensión turbia.
2. Pasar esta suspensión a una celda estéril para espectrofotómetro y comparar visualmente con el tubo 8 de Mc Farland (2.4×10^9 UFC), en caso de estar más turbia la suspensión resultante, agregar solución inyectable estéril (0.9% Laboratorio PISA) suficiente para obtener una turbidez igual al tubo 8 del nefelómetro. Posteriormente realizar un segundo ajuste en el espectrofotómetro entre 3 y 7 de transmitancia; y una vez ajustada la solución pasarla a un tubo de ensaye 13 x 100 con tapón de rosca estéril, almacenar a 4° C hasta su uso.

II. Estandarización de la carga bacteriana en el tubo capilar

1. Realizar la estandarización en la balanza analítica, pesar 10 tubos capilares vacíos uno por uno, obtener la media del peso de los tubos capilares pesados.
2. Marcar con tinta indeleble cada tubo capilar en tres partes iguales, llenar el tubo capilar a una tercera parte con agua común y sellar a la flama por ambos extremos, volver a pesar cada uno de los tubos nuevamente en la balanza y obtener una media del peso de los tubos capilares llenos a su tercera parte.

Este paso servirá para saber aproximadamente el valor en μL de la carga bacteriana por tubo capilar.

III. Ajuste de la concentración y esterilización de leche descremada Svelty mediante calor húmedo a presión.

1. Preparar 5 mL leche descremada al 10%, 5 mL de leche descremada al 15% y 5 mL de leche descremada al 20%, agregar 0.55 g, 1 g, 1.5 g de leche descremada Svelty en polvo respectivamente en matraces Erlenmeyer diferentes y diluir en 5 mL de Agua destilada.
2. Tapar los matraces con una torunda de algodón y esterilizar los tres matraces Erlenmeyer por calor húmedo a 121° C 15 lb de presión por 10 minutos en autoclave para evaluar que concentración de leche soporta mejor la temperatura de esterilidad sin que se desnaturalice.

IV. Prueba como crioprotector de la leche descremada de concentración elegida.

1. Tomar una muestra de 0.5 mL de la solución ajustada del paso I con una Micropipeta (BioHit Proline) y depositarla en un criotubo estéril de 2 mL con tapón de rosca que contengan 1.5 mL de leche descremada estéril a la concentración elegida, tapar, agitar y rotular. Almacenar hasta su uso.
2. Llenar a una tercera parte 30 tubos capilares estériles cerca del mechero en una zona limpia con la suspensión del paso anterior, sellar a la flama el tubo capilar por ambos extremos.
3. Colocar 10 tubos capilares sellados en un tubo de ensaye con tapón de rosca estéril, tapar y rotular a la temperatura a la que se va a almacenar, colocar otros 10 tubos capilares en un tubo de ensaye con tapón de rosca estéril, tapar y rotular a la temperatura a la que se va a almacenar y por ultimo colocar 10 tubos capilares sellados en un tubo de ensaye con tapón de rosca estéril, tapar y rotular a la temperatura a la que se va almacenar.

Repetir este procedimiento para cada una de las bacterias en estudio hasta obtener un total de 30 tubos capilares por bacteria.

V. Prueba de conservación a tres diferentes temperaturas (-20° C, 4°C, Temperatura ambiente).

1. Conservar los tubos capilares de cada bacteria a tres diferentes temperaturas (-20° C, 4° C y Temperatura ambiente,) como se especifica en el siguiente cuadro.

Cuadro 1. Conservación de Cepas.

BACTERIA	CRIOPROTECTOR	TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN.	CANTIDAD DE TUBOS CAPILARES
<i>Staphylococcus aureus</i>	Leche descremada	Temperatura ambiente	10
	Leche descremada	4° C	10
	Leche descremada	-20° C	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	Leche descremada	Temperatura ambiente	10
	Leche descremada	4° C	10
	Leche descremada	-20° C	10
<i>Escherichia coli</i>	Leche descremada	Temperatura ambiente	10
	Leche descremada	4° C	10
	Leche descremada	-20° C	10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Leche descremada	Temperatura ambiente	10
	Leche descremada	4° C	10
	Leche descremada	-20° C	10

VI. Prueba de viabilidad al tiempo 0,15,30,60,90 días.

Nota: La prueba de viabilidad al tiempo 0 se va a realizar el mismo día que se llenan y sellan los tubos capilares

1. Limpiar los extremos del tubo capilar con una torunda impregnada de solución alcohol-yodo Lymphoprep AXIS-SHIELD PoC. AS.
2. Marcar los extremos del tubo capilar con un lápiz punta diamante y romper por los extremos del tubo con unas pinzas, inocular su contenido en 5 mL de Caldo Soya-Trypticaseina BD BBL de un solo golpe, tapar, agitar e incubar a 37° C por 24 hs.
3. Posterior a las 24 hs de incubación tomar un inculo de 45 µL del caldo Soya-Trypticaseina del paso anterior y con una pipeta Powerpette JENCONS inocular una caja petri estéril Pyrex.
4. Agregar enseguida 15 mL de Agar Soya-Trypticaseina estéril a 45° C en la misma caja petri y homogenizar. Dejar solidificar e incubar a 37° C por 24 hs
5. A cada uno de los cultivos, realizar lectura de morfología colonial y microscópica a las 24 y 48 hs de incubación.

Nota: Realizar este procedimiento para cada periodo de conservación (0, 15, 30, 60,90 días) y para cada una de las bacterias en estudio.

VII. Coloración de Gram:

1. Se toma una pequeña porción de inóculo con un asa de platino previamente esterilizada, se coloca en un portaobjetos.
2. Fijar la preparación a la flama.
3. Realizar la coloración de Gram.
4. Agregar unas gotas de cristal violeta y dejar por un minuto.
5. Lavar la laminilla con abundante agua.
6. Agregar unas gotas de Lugol y dejar por 1 minuto.
7. Lavar la laminilla con abundante agua.
8. Agregar unas gotas de solución Alcohol-Acetona por 15 segundos.
9. Lavar la laminilla con abundante agua
10. Agregar safranina por 30 segundos.
11. Visualizar con el lente de inmersión 100x del microscopio de luz y reportar.

VIII. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

PRUEBA DE CATALASA

1. Colocar una gota de H_2O_2 sobre un portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur.
2. Suspender la bacteria.

Interpretación:

- Detectar la formación de burbujas. Se considera como prueba positiva.

PRUEBA DE COAGULASA

1. Tomar una muestra de la bacteria obtenida del cultivo con un asa bacteriológica y mezclar con 0.5 mL aproximadamente de plasma de conejo sobre un portaobjetos.

Interpretación.

- Se considera que la prueba es positiva si el plasma es coagulado en un lapso de 3-5 min.

PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

1. Suspender 1.5 g del medio Caldo Rojo de Fenol (CRF) en 100 mL de agua destilada y disolver en el caldo 0.5 g del hidrato de carbono que se evaluara.
2. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución.
3. Dispensar en tubos de ensaye (con campana de Durham si se requiere), tapar y esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.
4. Inocular el CRF con una gota de la suspensión bacteriana.
5. Incubar a 37° C durante 24 hs.
6. Examinar los tubos para evaluar crecimiento, producción de ácido y producción de gas.

Interpretación.

- La presencia de un color amarillo en el tubo indica una reacción positiva para la fermentación del hidrato de carbono. La presencia de una o más burbujas en la campana de Durham indica una reacción positiva para la producción de gas.

PRUEBA DE SULFURO- INDOL-MOTILIDAD

1. A partir del un cultivo, sembrar por punción profunda con aguja de inoculación recta (no usar asa con anillo). Se debe inocular el centro del tubo, y la punción debe abarcar 2 tercios de profundidad del medio de cultivo desde la superficie. Es importante que la siembra se realice en línea recta.
2. Incubar durante 24 hs, a 37° C, en aerobiosis.
3. Agregar 3-5 gotas de reactivo de Kovac´s o de reactivo de Erlich.

Interpretación.

- Cepas móviles: Producen turbidez del medio, que se extiende más allá de la línea de siembra.
- Cepas inmóviles: El crecimiento se observa solamente en la línea de siembra.
- Cepas H₂S positivas: Ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra o en todo el medio.
- Cepas H₂S negativas: El medio permanece sin cambio de color.
- Cepas indol positivas: Desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovac's o de Erlich.
- Cepas indol negativas: Sin cambio de color.

PRUEBA CON AGAR VERDE BRILLANTE

1. Suspender 58 g del medio en un litro de agua purificada, calentar y hervir con agitación suave hasta su completa disolución durante un minuto y esterilizar en autoclave a 121° C (15 libras de presión) durante 15 minutos.
2. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50° C y vaciar en placas de Petri estériles.
3. Para la identificación de *Escherichia coli* ATCC25922 a partir del cultivo, tomar con asa bacteriológica una muestra del crecimiento colonial de *E. coli* y sembrar en estría por agotamiento.
4. Incubar las placas a 35° C durante 24 hs y examinar el desarrollo colonial.

Interpretación.

- Las colonias típicas de *E. coli* aparecen como colonias de color blanco, opacas rodeadas por el rojo brillante del medio. Los pocos microorganismos que crecen en este medio que son fermentadores de lactosa o sacarosa, son fácilmente identificables debido a la formación de colonias amarillas- verdes rodeadas de una intensa zona de color amarilla-verdosa. Este medio no es adecuado para el aislamiento de *S. typhi* ni de *Shigella*, sin embargo algunas cepas de *S. typhi* pueden desarrollar dando colonias rojas.

PRUEBA CON AGAR CASMAN

1. Suspender 43 g del medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para su completa disolución. NO SOBRECALENTAR.
2. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 50° C.
3. Adicionar sangre de carnero estéril desfibrinada al 10%. Homogeneizar suavemente y vaciar en placas Petri estériles.
4. Inocular las placas con la muestra previamente procesada de acuerdo a los procedimientos establecidos.
5. Incubar las placas a 35 ± 2° C durante 24 hs en atmósfera de 5-10% de CO₂.
6. La morfología colonial típica se describe en el siguiente cuadro:

Cuadro 2. Morfología Típica en Agar Casman.

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Crecimiento satisfactorio
<i>Haemophilus influenzae</i>	Crecimiento satisfactorio
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Crecimiento con alfa hemolisis
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Crecimiento con beta hemolisis

16. RESULTADOS

En este apartado se presentan los resultados obtenidos durante la parte práctica del proyecto, al inicio en las tres primeras fotografías se presenta el diseño del micrométodo de conservación implementando en el laboratorio, después en el cuadro 3 y 4 se registran los resultados de las pruebas de viabilidad realizadas a cada una de las cuatro cepas durante los 90 días de conservación a -20°C , 4°C y Temperatura ambiente, seguido de Fotografías donde se muestran las características morfológicas de cada una y finalmente los cuadros 5 al 8 donde se registran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a cada una de las cepas.



Fotografía 1. Tubos capilares + bacteria c/ Crioprotector sellados a la flama.



Fotografía 2.



Fotografía 3.

Fotografías 2 y 3:
Almacenamiento de
tubos capilares en tubos
de ensayo de 16 x 150
rotulados y cerrados.

Cuadro 3. Resultados de las pruebas de viabilidad en dos microorganismos evaluados.

TIEMPO	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
	-20° C	4° C	26° C	-20° C	4° C	26° C
CERO	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
15 DÍAS	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
30 DÍAS	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
60 DÍAS	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Moderado
90 DÍAS	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Moderado	Nulo

En este cuadro se registran las lecturas de las pruebas de viabilidad realizadas en cada uno de los tiempos establecidos para las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC29212.

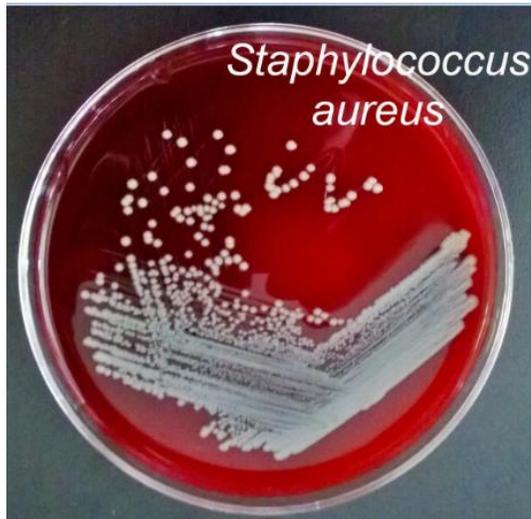
Cuadro 4. Resultados de las pruebas de viabilidad en dos microorganismos evaluados.

TIEMPO	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
	-20° C	4° C	26° C	-20° C	4° C	26° C
CERO	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
15 DÍAS	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
30 DÍAS	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable
60 DÍAS	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	Moderado	Nulo
90 DÍAS	Incontable	Incontable	Moderado	Incontable	Moderado	Nulo

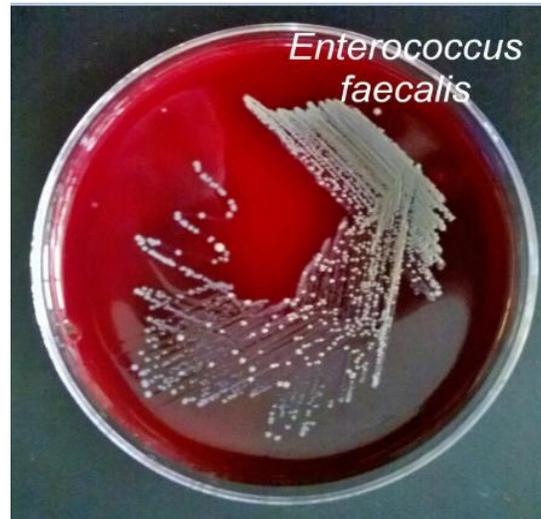
En este cuadro se registran las lecturas de las pruebas de viabilidad realizadas en cada uno de los tiempos establecidos para las cepas evaluadas de *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA.

Fotografías de las cepas en estudio inoculadas por la técnica de Sembrado por Agotamiento en Agar Casman para la lectura de morfología colonial.



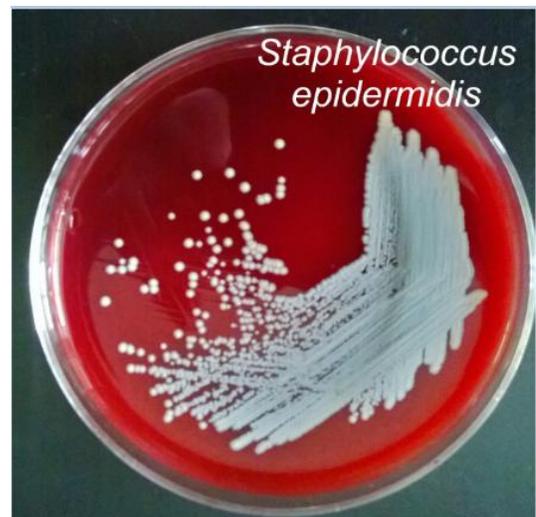
Fotografía 4. *S. aureus* ATCC29213



Fotografía 5. *E. faecalis* ATCC29212



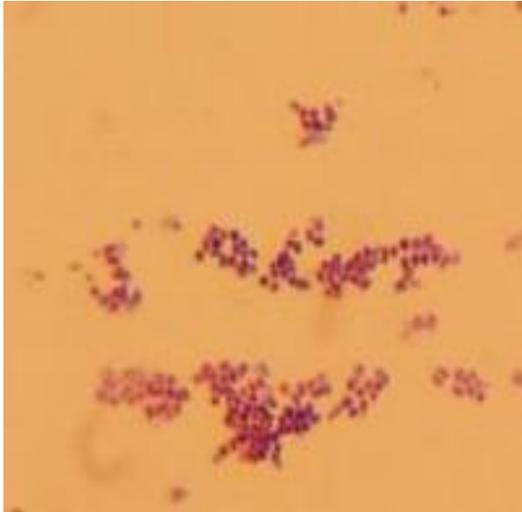
Fotografía 6. *E. coli* ATCC25922



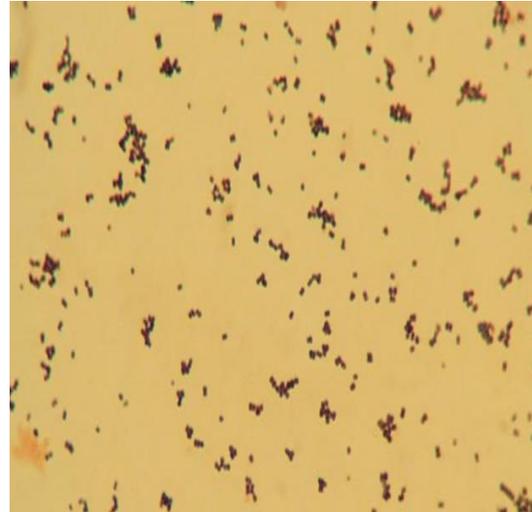
Fotografía 7. *S. epidermidis* ATCC12228

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA.

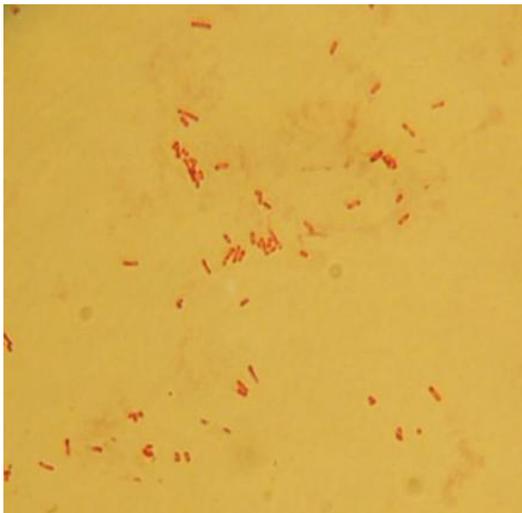
Fotografías de las observaciones microscópicas a 100X en un microscopio electrónico (PRIMO STAR ZEISS) de las 4 cepas bacterianas.



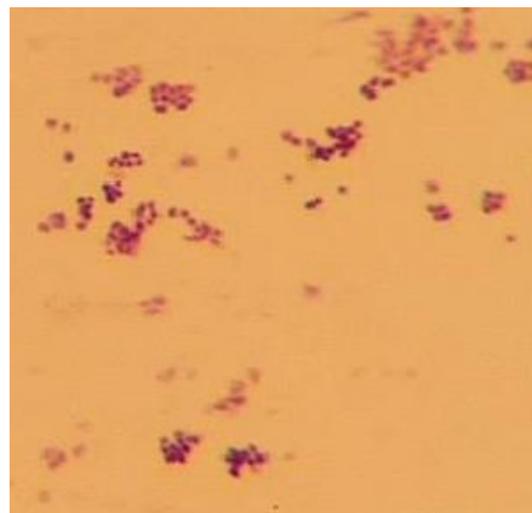
Fotografía 8. *S. aureus* ATCC29213



Fotografía 9. *E. faecalis* ATCC29212



Fotografía 10. *E. coli* ATCC25922



Fotografía 11. *S. epidermidis* ATCC12228

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Cuadro 5. Pruebas Bioquímicas.

	Temperatura ambiente		Refrigeración		Congelación	
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2
Caldo Rojo de fenol + Glucosa	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Caldo Rojo de fenol + Manitol	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Catalasa	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Coagulasa	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Se presenta los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC29213.

Cuadro 6. Pruebas Bioquímicas.

	Temperatura ambiente		Refrigeración		Congelación	
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2
Caldo Rojo de fenol + Glucosa	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Caldo Rojo de fenol + Lactosa	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Caldo Rojo de fenol + Manitol	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Catalasa	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Se presenta los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC29212.

* |García López Edgar

Cuadro 7. Pruebas Bioquímicas.

	Temperatura ambiente		Refrigeración		Congelación	
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2
Caldo Rojo de fenol	+++	+++	+++	+++	+++	+++
+ Glucosa	c/ gas	c/ gas	c/ gas	c/ gas	c/ gas	c/ gas
Caldo Rojo de fenol	+++	+++	+++	+++	+++	+++
+ Lactosa						
Caldo Rojo de fenol	+++	+++	+++	+++	+++	+++
+ Manitol						
Sulfuro	-	-	-	-	-	-
Indol	+	+	+	+	+	+
Movilidad	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+

Se presenta los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa *Escherichia coli* ATCC25922.

Cuadro 8. Pruebas Bioquímicas.

	Temperatura ambiente		Refrigeración		Congelación	
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 1	Tubo 2
Caldo Rojo de fenol + Glucosa			+++	+++	+++	+++
Caldo Rojo de fenol + Lactosa			+++	+++	+++	+++
Caldo Rojo de fenol + Sacarosa			+++	+++	+++	+++
Catalasa			+	+	+	+
Coagulasa			---	---	---	---

Se presenta los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a la cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228.

17. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este apartado se analizan los resultados obtenidos de las pruebas morfológicas y bioquímicas realizadas a las cepas en estudio durante 90 días de conservación a tres diferentes temperaturas.

CEPAS:

Staphylococcus aureus ATCC29213

Enterococcus faecalis ATCC29212

Escherichia coli ATCC25922

Staphylococcus epidermidis ATCC12228

PRUEBA DE VIABILIDAD

En esta prueba se evaluó la viabilidad de cada una de las cepas con la técnica de vaciado en placa durante 90 días de conservación a tres diferentes temperaturas en Agar Soya-Trypticaseina. En el Cuadro 3 se registran los resultados de las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC29212, en esta prueba sólo se tomo en cuenta el crecimiento de las cepas después de 24 y 48 hs de incubación a 37° C, en el cuadro se puede observar que el crecimiento de *S. aureus* fue satisfactorio con la técnica de conservación implementada durante todo el periodo de conservación a las tres distintas temperaturas, para el caso de *E. faecalis* el método implementado fue satisfactorio a una temperatura de conservación de -20° C; no así para la temperatura de conservación de 4° C donde el método solo fue eficiente durante un periodo de 60 días observándose una disminución aproximadamente del 40% a los 90 días de conservación. A Temperatura ambiente el método fue capaz de conservar viable a *Enterococcus faecalis* por un periodo de 30 días de conservación ya que a los 60 y 90 días no presento crecimiento.

En el Cuadro 4 se registran los resultados obtenidos de las pruebas de viabilidad de las cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, en el cuadro podemos observar que el crecimiento de *E. coli* a -20° C y 4° C fue incontable, por el contrario a Temperatura ambiente el método

implementado solo fue capaz de mantener su viabilidad hasta los 60 días de conservación. Para el caso de *S. epidermidis* la implementación del método resulto útil a una temperatura de -20° C, y a 4° C solo puede considerarse adecuado el método para un periodo de 60 días de conservación, pues a los 90 días mostró una disminución en su desarrollo de aproximadamente 50%, con relación al crecimiento del microorganismo conservado a Temperatura ambiente éste fue favorable sólo por un periodo de 30 días de conservación.

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA.

En esta parte del método evaluaron las características que presentaron las colonias de cada una de las cepas en estudio, en la cual se tomaron en cuenta distintos aspectos relacionados con la forma, tamaño, color, consistencia, elevación, luz transmitida, luz reflejada y el aspecto de sus bordes.

En Agar Casman *Staphylococcus aureus* presento colonias de 1 mm de diámetro, redondas, de borde definido, con una coloración beige, convexas de consistencia cremosa, mate y translucidas (Fotografía 4), para *Enterococcus faecalis* las colonias se caracterizaron por ser de color crema o marrón claro, redondas, de tamaño puntiforme, ligeramente elevadas, de aspecto cremoso, con bordes definidos, mate y translucidas (Fotografía 5).

Estos mismos aspectos se tomaron en cuenta para la cepa *Escherichia coli*, las colonias desarrolladas después de 24 y 48 hs de incubación presentaron un tamaño de 1-2 mm de diámetro aproximadamente, forma redonda, de bordes irregulares, convexas, de consistencia cremosa, color gris, mate y translucidas (Fotografía 6), para la evaluación de la viabilidad de la cepa *Staphylococcus epidermidis*, durante los 90 días de conservación a -20° C, 4° C y 26° C, las colonias resultantes fueron de un tamaño que oscilaba alrededor de los 2 mm de diámetro, forma redonda, con un color blanco, de bordes regulares, convexas y de consistencia cremosa, mate y translucidas (Fotografía 7).

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA.

Se tomo una muestra de *Staphylococcus aureus* del cultivo en Agar Soya-Trypticaseina, se tiño por la técnica de Gram observándose las mismas características que presento antes del método de conservación, cocos Gram positivos en pares y en racimo como esta descrito en la guía de conservación de microorganismos de la Facultad de Química ¹⁴ (Fotografía 8). Para la cepa de *Enterococcus faecalis* se visualizaron las mismas características que tenia antes del proceso de conservación, cocos en pares y en cadenas Gram positivos (Fotografía 9). Para *Escherichia coli* (Fotografía 10) y *Staphylococcus epidermidis* (Fotografía 11) se determino que después de haber sido conservadas por un periodo de 90 días con el método implementado no se observo ningún cambio en la morfología microscópica de estos microorganismos

PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Los resultados que se presentan en el Cuadro 5, se refieren a las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a la cual se le realizo una prueba de fermentación de glucosa y manitol que tuvo como resultado la liberación productos ácidos que fueron detectados debido al viraje del indicador rojo de fenol a una coloración amarilla del medio, la prueba de catalasa arrojó un resultado positivo debido a la formación de pequeñas burbujas esta reacción se puede interpretar de la siguiente manera $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, la bacteria catalizó la reacción separando la molécula de peróxido de hidrogeno en dos moléculas de agua y una de oxígeno lo que explica el burbujeo al aplicar el H_2O_2 sobre la bacteria, la prueba de coagulasa fue positiva debido a la formación de un pequeño coagulo el cual sólo es capaz de formar *Staphylococcus aureus* a diferencia de otras especies del mismo género de acuerdo en lo descrito en el manual de pruebas bioquímicas MacFaddin lo que confirma que se mantuvieron las características bioquímicas de la cepa con el método de conservación implementado.

El Cuadro 6 contiene los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas que se le realizaron a la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC29212, las pruebas que se realizaron fueron la determinación de fermentación de tres hidratos de carbono diferentes (Glucosa, Lactosa y Manitol) , los resultados muestran un viraje del indicador rojo de fenol a una coloración amarilla en todo el medio después de 24 hs de incubación, debido a la formación de productos ácidos como el ácido láctico a partir de lactosa, lo que se interpreta como un resultado positivo; para la prueba de catalasa el resultado fue positivo por la presencia de pequeñas burbujas de O₂, como lo marca la bibliografía estas son pruebas que corresponden a *Enterococcus faecalis*. En el Cuadro 7 se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación de la cepa *Escherichia coli* ATCC25922, a la cual se realizaron tres pruebas de fermentación de hidratos de carbono (glucosa, lactosa y manitol), después de 24 hs de incubación el resultado obtenido fue una coloración amarilla total del medio más la producción de gas en presencia de glucosa, lo cual indica que hubo una formación de productos ácidos finales mas CO₂ y por lo tanto positivo, la prueba de indol dio un resultado positivo debido a la formación de un anillo color rojo ladrillo después de agregar el reactivo de Kovac's, en la prueba de Motilidad el resultado fue positivo y para la prueba de producción de sulfuro negativo, la presencia de la enzima catalasa se determino por la formación de Oxígeno (O₂) al visualizar pequeñas burbujas después de agregar peróxido de hidrogeno (H₂O₂).

El crecimiento del microorganismo en Agar Verde Brillante es consistente con el crecimiento reportado por la literatura para *Escherichia coli*, observándose colonias blancas rodeadas de un halo rojo brillante.

Para el caso de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 se inoculó la bacteria en caldo rojo de fenol para evaluar su capacidad fermentativa de glucosa, lactosa y sacarosa; ya que *S. epidermidis* es la única especie del genero *Staphylococcus sp.* que puede fermentar sacarosa, el resultado obtenido a las 24 hs de incubación sugiere que se trata de éste microorganismo como lo marca el manual de pruebas bioquímicas Mac Faddin. La actividad de la catalasa se visualizo por la presencia de burbujas de O₂ cuando se agrego H₂O₂.

Según lo especificado en la Guía conservación de Microorganismos estas son pruebas que corresponden a *Staphylococcus epidermidis*.

18. CONCLUSIONES

- Para el primer y segundo objetivos particulares; se diseñó un método de conservación empleando leche descremada al 15% como agente crioprotector, a partir del método de Sordelli.
- Para el tercer objetivo se concluye que el método implementado es ideal para conservar *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 a -20°C ya que logro mantener la viabilidad de los mismos por un periodo de 90 días, con un crecimiento de recuperación de 100% del cultivo.
- Para la temperatura de conservación a 4°C se mantuvo la viabilidad en un 70% de las cepas en estudio y a Temperatura ambiente se observó una viabilidad menor al 50%.
- Finalmente los resultados indican que se logro establecer un método de conservación sencillo, económico, de fácil almacenamiento y eficiente para conservar microorganismos a -20°C , por un periodo de al menos de 90 días.

PROPUESTA

- Se propone que se prosiga con el estudio de viabilidad al menos hasta los seis meses.
- Se sugiere realizar un cepario mediante este método.

19. REFERENCIAS

1. García MD, Uruburu F. Colección española de cultivos. La conservación de cepas microbianas. Bogotá Colombia: Universitat de València; 2000.
2. Castro G, Hernández JT, Aquino C. Manual sobre conservación de microorganismos. México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; 2000.
3. Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. Revista Argentina de Microbiología. 1998; 30:42-51.
4. Smith D, Green P, Day J. Management and maintenance of culture collections. La Habana: Instituto de Sueros y Vacunas Finlay; 2000:22.
5. Watson JD, Tooze J, Kurtz DT. ADN Recombinante. Introducción a la ingeniería genética. Barcelona: Editorial Labor; 1986.
6. Rehm HJ, Reed G. Biotechnology microbial fundamentals. Vol.1. Alemania: Editorial Verlag Chemie; 1981.
7. Sambrook J, Maccallum P, Russell DW. DNA cloning. A practical approach. Volume 1. Australia: Editorial D.M. Glover. IR L Press Limited. 1985.
8. Zubay G. Genetics. New York: Editorial The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc; 1987.
9. Snell JJS, Kirsop BE, Doyle A. General introduction to maintenance methods. Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods. London: Academic Press; 1991:21-30.
10. Hawksworth DL, Sastramihardja I, Kokke R, Stevenson R. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. World Federation of Culture Collection Standard Committee. UK: Simwoth Press. 1999:24.
11. Koneman E, Roberts G. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas en color. 6ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2012.

12. Tortora GJ, Funke VR, Case CL. Introducción a la microbiología 9^a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.
13. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Curso Teórico-Práctico de Postgrado. Preservación de cultivos en Microbiología Clínica. La Pampa Buenos Aires: Departamento de Química Biológica y de Ciencias Biológicas. UBA; 2002.
14. Facultad de Bioquímica y ciencias Biológicas. Guía para la conservación de microorganismos. Cátedra microbiológica General. UNL 1999.
15. Ribbons DW. Methods in microbiology. Vol. 3 Newport: Editorial J.R. Norris, Academic Press; 1970.
16. Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. Principles of fermentation technology. 2^{da} ed. New Delhi: Editorial Pergamon Press; 1984.
17. Prescott, Harley y Klein. Microbiología. 7a ed. España: Editorial McGraw-Hill-interamericana, S.A.U; 2009.
18. Kenneth JR, George CR, Champoux JJ, Neidhardt FC. Microbiología médica. 4a ed. México: Editorial MacGraw-Hill-interamericana; 2007.
19. Probac. Escala nefelometría de Mc Farland. [en línea] Brasil. [Actualización 2012; Consulta 25 de mayo de 2013]. Disponible en: <http://www.probac.com.br/bulas/nefelobac.pdf>.
20. World Federation for Culture Collections. Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos" [en línea] [Actualización 2012; Consulta 19 de junio de 2013]. Disponible en: http://www.wfcc.info/pdf/Guia_WFCC_espa_ol.pdf.
21. Romero CR. Microbiología y Parasitología Humana. 3^a ed. México: Editorial Médica panamericana; 2007.
22. Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K & Swings J (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic microbial. Revs. 60:407-438.

23. Universidad Nacional de Cuyo. Revista de la facultad de ciencias agrarias. Una variante del método de Sordelli para la conservación de cepas microbianas por desecación al vacío. Argentina: Editorial Mendoza digitalizado 12-febrero 2008.
24. MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3^{ra} ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2004.
25. Madigan MT, Martinkoy J, Parker B. Biología de los microorganismos. 10^a ed. España: Editorial Prentice Hall; 2003.
26. Ramírez-Gama RM, Luna MB, Velásquez MO, Vierna GL. Manual de prácticas de microbiología general. 5^a ed. México: Facultad de Química, UNAM; 2006.
27. Vullo D, Wachsman M, Alche L. Microbiología en práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de microbiología básica y aplicada. 1^a ed. Argentina: Editorial Atlante S. R. L; 200.
28. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 5^a ed. Barcelona España: Editorial Elsevier; 2008.
29. Volk WA, Gebhardt BM, Kadner RJ, Hammarskjol ML. Essentials of medical microbiology. 5^a ed. Philadelphia. New York. United States American: Lippincott-Raven Publishers; 1996: 317.
30. Brooks GF, Butel JS, Carroll KC, Morse SA. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19^a ed. México: Editorial El Manual Moderno; 2008.
31. Cowan MK, Park TK. Microbiology a systems approach. New York. United States American: Editorial Pharmaceutical Press, 2004.
32. Brock TD, Madigan MT. Biology of Microorganisms. 5^a ed. New Jersey United States American: Editorial Prentice Hall; 1988.
33. Gerard JT, Berdell R, Funke C, Case L. Introducción a la Microbiología. 9^a ed. Buenos Aires Argentina: Editorial panamericana; 2007.
34. BD BBL LAB, S.A. de C.V. Agar Soya-Trypticaseina. [en línea] México. <http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22764> [Consulta 19 de junio de 2013].

35. BD BBL LAB, S.A. de C.V. Caldo Soya-Trypticaseina. [en línea] México.
<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22764> [Consulta 19 de junio de 2013].
36. BD BBL LAB, S.A. de C.V. Agar Verde Brillante. [en línea] México.
<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22764> [Consulta 19 de junio de 2013].
37. BD BBL LAB, S.A. de C.V. Agar Casman. [en línea] México.
http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/211106.pdf [Consulta 19 de junio de 2013].
38. BD BBL LAB, S.A. de C.V. Caldo Rojo de Fenol. [en línea] México.
http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007486%2809%29%280606%29_E_S.pdf [Consulta 19 de junio de 2013].
39. BD BBL LAB, S.A. de C.V. SIM Medium (sulfuro, indol, motilidad). [en línea] México.
<http://www.bd.com/ds/productCenter/221011.asp> [Consulta 19 de junio de 2013].
40. Controles Microbiológicos para la Investigación [en línea]
http://www.atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/By_Focus_Area/Pharmaceutical_Research.aspx [Consulta 8 de Mayo de 2013].

20. ANEXO I. ESCALA DE Mc FARLAND

La escala nefelometría de turbidez Mc Farland es usada para determinar la intensidad de proliferación de bacterias en medios de cultivo, esta multiplicación en medios líquidos se manifiesta por un aumento de partículas (bacterias) que se oponen al libre paso de la luz o la opacidad en el centro. Cuando mayor sea el número de bacterias, mayor será la opacidad del medio.

La finalidad es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana y por espectrofotometría se crea una recta patrón, de forma que se pueda detectar la concentración de las diluciones bacterianas (de manera aproximada, ya que depende de factores como el tamaño de la bacteria y la formación de agregados).

Se trata de una serie numerada de 10 tubos. La escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico con diferentes cantidades de cloruro de bario al 1% y ácido sulfúrico al 1%, para obtener diferentes concentraciones de sulfato de bario, que corresponden a diferentes recuentos bacterianos. La equivalencia de UFC/mL se muestra en el siguiente cuadro¹⁸.

Escala de Mc Farland

TUBO	Cl ₂ Ba 1%	SO ₄ H ₂ 1%	U.F.C/mL
1	0.1	9.9	3.0x10 ⁸
2	0.2	9.8	6.0x10 ⁸
3	0.3	9.7	9.0x10 ⁸
4	0.4	9.6	1.2x10 ⁹
5	0.5	9.5	1.5x10 ⁹
6	0.6	9.4	1.8x10 ⁹
7	0.7	9.3	2.1x10 ⁹
8	0.8	9.2	2.4x10 ⁹
9	0.9	9.1	2.7x10 ⁹
10	1.0	9.0	3.0x10 ⁹

Procedimiento: Comparar los tubos a simple vista con el tubo de bacterias. Antes, agitar los tubos vigorosamente, debido a que el sulfato de bario tiende a precipitar. También homogenizar el tubo con el cultivo bacteriano, para tener una suspensión (aspecto turbio) uniforme.

Se recomienda hacer lecturas comparativas de los tubos, colocándolos contra un texto impreso de modo que una mayor o menor claridad de las letras a través de la solución indica mayor o menor turbidez ¹⁸.