



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Implementación de un medio de crioconservación bacteriana y  
fichas de identificación del cepario de FES Zaragoza.**

Tesis que para obtener el título de:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

Presenta:

**SILVA DOMÍNGUEZ MANUEL JESÚS**

**Director:**

Q.F.B. Patricia Vidal Millán

**Asesor:**

Q.F.B. Pablo Juárez de los Santos





## Agradecimientos

A mi madre Isabel, porque nunca sabré si estás tú más orgullosa de mí o yo de ti, por que has sido madre, padre, amiga y maestra, por que me apoyaste y me impulsabas aún en los momentos más difíciles en nuestras vidas. Que con esta dedicatoria no te devuelvo ni la mínima parte de lo que me brindaste. Te amo

A mi hermana Lucero, estuviste ahí en mis primeros juegos de química y me encantaba que hiciéramos experimentos juntos, por nuestras locuras y nuestro cariño.

A mis titos Lina y Ángel, quienes me apoyaron desde mis primeros triunfos escolares y en este último siguen aquí, en espíritu y físicamente, con el amor que ha hecho una familia unida.

A mis tíos, primas y sobrinas, siempre han sido un motivo y un apoyo. Sigo el ejemplo de los primeros y trato de serlo para las segundas, el camino por delante es arduo, aun más que el que dejo atrás, pero estando con ustedes, sé que será más fácil.

A mis amigos, hermanos de esta vida, sin importar donde los conocí, porque de ellos he aprendido en las buenas y en las malas.

A Araceli que durante estos años compartimos y sobrepasamos tantos retos tomados de la mano, por estar a mi lado, gracias.

A la vida porque me regalo la oportunidad de estar en la UNAM con los profesores que me enseñaron más que a ser QFB, a ser profesional.



“La bacteria mas pequeña resume abismos de misterio  
que dejan en suspenso el pensamiento vinculado  
con la técnica y desencadenan la fantasía”



## Índice

Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	4
Planteamiento del problema	11
Objetivos	12
Hipótesis	13
Diseño experimental	13
Método	14
Resultados	16
Fichas de identificación bacteriana	17
Discusión de resultados	41
Referencias	42



## Resumen

La conservación del cepario en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza se ha mantenido por el método tradicional de resiembra periódica en agar, sin embargo este método causa que constantemente las cepas se contaminen y se pierdan por las propias características de la técnica.

En el presente trabajo se pretende realizar una actualización técnica, que beneficie al Laboratorio de Producción y Microbiología de la Facultad, disminuyendo costos, incrementando periodos de conservación y asegurando la procedencia o características de las cepas conservadas.

Además de ello, este trabajo representa un beneficio para los alumnos de la carrera de Química Farmacéutico Biológica, Medicina y Odontología, que tendrán organismos más estables en las prácticas que brindarán resultados más fiables, una síntesis práctica de las características morfológicas y fisiológicas de los problemas que se encontrarán en el transcurrir de sus clases y módulos de laboratorio.

Se desarrolló un medio de cultivo que contiene un agente crioprotector penetrante y otro que no lo es, de tal forma que se logró que la recuperación de los organismos después de un año de congelación fuera mayor al 80%, este método no es nuevo ya que se reporta el uso de dichos agentes en varios estudios a nivel internacional, lo que permitió que se extrapolara a la colección estudiada.

Además del medio que permitirá lograr contar con cepas estables, se generó un catalogo con las fichas de identificación de los microorganismos, y una serie de laminillas fijas teñidas por la técnica de Gram que incrementarán las posibilidades didácticas del trabajo.



## Introducción

El presente documento pretende cubrir distintas finalidades en el ámbito académico dentro del proceso enseñanza-aprendizaje de la Microbiología Médica.

La relación entre los microorganismos y el hombre ha existido desde el momento mismo de nuestro nacimiento como especie, sin embargo la comprensión de la misma apenas lleva unos cuantos años de haberse iniciado, por lo que en este tiempo se ha incrementado la necesidad de contar con colecciones bacterianas que sean confiables (1).

Para los alumnos que se encuentran en algunas de las carreras relacionadas con el área de la salud es imprescindible conocer a estos microorganismos que aunque diminutos tienen un papel sumamente importante tanto benéfico como perjudicial.

El conocimiento acerca de las bacterias representa un obstáculo para los alumnos de Microbiología Médica en la FES Zaragoza ya que como primer acercamiento hacia ellas son demasiado complejas en su entender metabólico y estructural, por ello se pretende la elaboración del material didáctico en el cual los alumnos puedan apoyarse para el análisis y resolución de los problemas que se presentan en clase.

Como primer punto se pretende realizar un catálogo que sirva de apoyo para los alumnos y profesores como ayuda para el conocimiento del crecimiento, cultivo e identificación de aquellas bacterias de importancia para la carrera de Química Farmacéutica Biológica. Ya que en el apartado de cada especie bacteriana se incluyen los medios de cultivo recomendados para su crecimiento y su identificación de manera sencilla.

Bajo el nombre de cada bacteria se encontrará una pequeña descripción morfológica acerca de la misma, incluyendo los tipos de infecciones que pueden generar en el ser humano, además un listado de los medios de cultivo que la literatura reporta para su crecimiento de manera exponencial, o medios que permitan una aproximación para la identificación de los mismos, la mayoría de ellos son comercializados como tal o requieren de suplementos especiales, específicamente hablando de antibióticos, de igual forma las pruebas más importantes que ayudan a la identificación o caracterización de género y especie de las mismas.

En la mayoría de los casos los alumnos entienden los métodos mediante los cuales se pueden destruir a las bacterias, sin embargo poseen de un muy bajo conocimiento en el campo de la conservación bacteriana, procedimiento sumamente importante en muchas clases de ensayos, los cuales serían imposibles de realizar si la especie bacteriana en cuestión muriera o tuviera que ser cambiada.

Las distintas colecciones y estudios realizados en el mundo con respecto a la conservación bacteriana se tomaron como referencia para la realización de controles de seguridad para los crioviales y la preparación de los medios de cultivo.



Se pretendió utilizar la criopreservación en la mayoría de los casos ha sido reportada en un medio protector con leche descremada y mantener una temperatura de  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sin embargo la utilización de medios especiales para las bacterias que son exigentes requirió de formulación extra para los ensayos.

Por último este catálogo incluye una colección completa de frotis teñidos por la técnica de Gram, con la finalidad de lograr que los alumnos estén familiarizados con la morfología y visualización de los cultivos en la práctica, además de que el alumno y el profesor puedan completar el ciclo de enseñanza-aprendizaje con el apoyo de recursos adicionales a la clase.

La innovación de este trabajo es la inclusión de nuevas cepas a la colección ya existente en FES Zaragoza así como el trabajo de elaboración de un medio de cultivo y el análisis del mismo para procurar la conservación a largo plazo de las cepas bacterianas. El radical cambio entre la conservación tradicional por resiembra periódica y la criopreservación es probablemente el mayor beneficio para el Laboratorio de Producción de la Facultad, así como para los alumnos y los profesores que evitarán confusiones por mutaciones de las cepas.



## Marco teórico

Una colección bacteriana o cepario bacteriano es propiamente dicho un conjunto de microorganismos los cuales están identificados y ordenados de manera que se conocen sus características y su comportamiento, bien estas colecciones pueden tener a estos seres metabólicamente activos y reproduciéndose, o disminuir su tasa metabólica casi en su totalidad. (1)

Las colecciones bacterianas a pesar de poseer múltiples diferencias todas tienen el mismo propósito: mantener y preservar una especie en cuestión de manera que sea reproducible el resultado de un ensayo; aun cuando se trata de seres vivos que sabemos que constantemente se encuentran reproduciéndose y por ende mutando. Cada colección alrededor del mundo se encuentra amparada bajo las capacidades económicas del programa que las resguarda, utilizando recursos que en mayor o menor medida garantizan la condición arriba descrita, existen aquellas que son un marco de referencia a nivel internacional, entre las más reconocidas destacan ATCC (American Type Culture Collection) y NCTC (National Culture Type Collection) quienes además de la conservación, se encargan de la venta y la distribución de estas referencias biológicas, así como aquellas particulares BioMerieux por ejemplo o industrias cerveceras y vinicultoras alrededor del orbe, incluso hay colecciones de unas decenas de ejemplares que son utilizadas en institutos pequeños, un ejemplo de ello es el cepario de FES Zaragoza.(2)

El principal método que se utiliza a nivel mundial para la conservación de estas colecciones es la liofilización, proceso que garantiza una buena supervivencia de los mismos y además evita la mutación y la constante resiembra necesaria para otros métodos. Otra técnica sumamente socorrida es la que se implementará durante el presente trabajo; la conservación con medios crioprotectores a  $-70^{\circ}\text{C}$  ha demostrado tener excelentes rendimientos y pocos problemas técnicos así como de costos comparados con la referencia que es la liofilización. (3)

Se suele recurrir a la conservación por la disminución de la actividad metabólica de los microorganismos, se entiende por metabolismo al proceso de degradación y biosíntesis enzimática que tiene lugar dentro de la célula y por medio del cual se mantienen las actividades nutricionales y funcionales(4), si se mantiene este ritmo en un umbral lo suficientemente bajo, la posibilidad de que se produzcan mutaciones generacionales se abate de manera que el comportamiento de los microorganismos cada vez que se pruebe será igual.

Alrededor del mundo se realizan todos los días investigaciones y descubrimientos que están íntimamente relacionados con los microorganismos cuyos resultados marcan diferencias en el día a día de la ciencia(1), pero ¿Cómo estos resultados son comprobables y reproducibles?, si una bacteria no es exactamente igual a otra pues cada vez que el material genético de estas es duplicado se generan cambios que pueden ser significativos o no, la respuesta radica en las colecciones que garantizan que los microorganismos que son surtidos de esta colección tienen una tasa de cambio que está estimada y permanece sin variaciones significativas durante dos resiembras



periódicas. A partir de esta premisa se generan un conjunto de términos que es necesario conocer y aplicar como aprendices de las ciencias microbiológicas.

Cepa bacteriana: cultivo puro de bacterias formada por los descendientes de un solo aislamiento, si se tiene un conjunto de cepas caracterizadas y organizadas se tendrá una colección, las colecciones bacterianas pueden ser desde muy pequeñas en sitios privados hasta instituciones con millares de ejemplares dedicadas enteramente a los cultivos, subcultivos y distribución de las mismas.(2)

Cultivo tipo: es una cepa que esta estandarizada cuya entrega por un organismo reconocido incluye un documento en el que se garantizan sus propiedades fisiológicas, como lo había citado previamente, esta garantía es perdida al realizar un tercer subcultivo de la clona. (2)

Cultivo de referencia: cultivo realizado en un laboratorio partiendo de un cultivo tipo, que sirve como estándar comparativo para las pruebas de rutina realizadas en el laboratorio, sin embargo por el método de conservación y el número de resiembras que este mismo lleva, no es posible asegurar la fiabilidad de su comportamiento. (3)

Cultivo mixto: es aquel en el que en el mismo medio de cultivo conviven dos o más microorganismos diferentes de manera natural.

Cultivo contaminado: aquel cultivo que ha sido invadido por cualquier otra clase de entidad biológica, comúnmente en las cepas bacterianas ocurre la contaminación por fagos, hongos e incluso ácaros, o en un caso aun mas preocupante, la infestación por mutantes celulares de la misma especie. (3)

Las pérdidas económicas y en tiempo que son generadas por la pérdida o contaminación de los cultivos de referencia han sido el motivo que más ha impulsado a hacer el análisis de las causas de fracaso, lo que en general deriva de dos fuentes totales, las atribuibles a la propia técnica, y las atribuibles a los errores humanos. En el primer caso las causas más comunes de las pérdidas es por la propia contaminación inherente a la exposición continua y la reproducción de los microorganismos, las segundas implican una mala ejecución de los métodos que ya han sido diseñados y probados, ambas pueden tener soluciones si el caso en concreto se estudia. (4)

El objetivo principal de estas colecciones bacterianas es proporcionar una referencia para los investigadores, médicos o microbiólogos en general para los ensayos realizados en sus laboratorios, de manera que poseen información y material suficiente para utilizarse en la confirmación de resultados (3).

El primer paso para obtener un cultivo de referencia es tener una suspensión de microorganismos numerosa, de preferencia esta debe de provenir de una fuente confiable, un organismo o instituto que certifique el material biológico que se provee, dicha suspensión debe poseer nutrientes en exceso y que está en la cúspide de la fase logarítmica de crecimiento, justo antes del inicio de la fase estacionaria, lo mas adecuado es que esta suspensión provenga de un inóculo muy pequeño, lo que



disminuiría las probabilidades de la selección aleatoria de mutantes. Para la mayoría de las bacterias de importancia clínica éste periodo es aproximadamente a las 16-18 horas de haber sido colocada la siembra inicial, de no ser así, las bacterias no pudieron hacer uso de los recursos biológicos a su alrededor ni incrementar de manera adecuada la biomasa correspondiente, lo que generaría un cultivo conservado pero con poca viabilidad. (5)

Una vez concluida esta fase, se procede a hacer el cambio del medio de estos microorganismos del enriquecimiento a un agente crioprotector (criopreservación), o someterlos a un proceso de liofilización, o a un medio con nutrientes con menor biodisponibilidad (resiembra periódica) con el objeto de frenar la actividad del cultivo de tal suerte que estos se mantengan vivos pero no en reproducción, en resumen la segunda fase de las técnicas es muy dependiente de lo que se pretenderá lograr y de los recursos disponibles, si se desea una conservación a largo o a corto plazo. (5)

Para la conservación en medio crioprotector se elige un agente que evite en su mayoría los cambios generados en las células al ser sometidas al proceso de congelación, es decir el incremento en la concentración de solutos, marcadas diferencia en las actividades enzimáticas, conductividad eléctrica, acumulación de los productos metabólicos intermediarios, etc.(6). Existen en la literatura mas de un ejemplo de agentes crioprotectores como el dimetilsulfóxido, el glicerol, la formamida, el sulfato de amonio, la albúmina o incluso las soluciones glucosadas, todas estas sustancias tienen como característica especial que actúan no mientras la temperatura está por debajo de los 0 °C, situación ante la cual la mayoría de las bacterias sobrevive; si no que generan su efecto en el paso de un estado del medio que las rodea a otro, tanto la solidificación como la fusión, ya que durante estos cambios existen la formación de cristales, los cuales al alinearse provocan ruptura de paredes y membranas, así como la acumulación de solutos, lo que genera cambios en la presión osmótica que pueden resultar en lisis, (7) estos cambios de estado de agregación son microscópicamente muy complejos y dramáticos, envuelven un sinnúmero de pasos en los cuales de los que tienen prioridad en ser evitados es el congelamiento intracelular o la salida de líquido del interior de las bacterias, es por ello que la elección del agente crioprotector es una actividad que no debe tomarse a la ligera pues implica el éxito del medio de preservación o su fracaso.

Básicamente los crioprotectores se pueden dividir en dos grupos, los penetrantes y los no penetrantes, los primeros ayudan a proteger las células por la formación de puentes de hidrógeno lo que ayuda a retener el agua dentro de la células, los no penetrantes aún no está claramente definido su mecanismo de acción, sin embargo se cree que producen inestabilidad en los cristales en formación, produciendo que el hielo no fracture las estructuras celulares si no que se adapten a su forma, de igual manera los protectores de altos pesos moleculares como la proteínas de adhieren a las membranas formando una capa que protege contra el daño mecánico que generan los cristales de hielo en crecimiento.(8)

Otro aspecto que debe ser considerado durante la composición de un cepario criopreservado es la temperatura a la que se mantienen estos cultivos. Generar un



control a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  emite buenos rendimientos, la temperatura más baja implica una menor tasa metabólica, cristales de hielo más estables y por ende menores pérdidas en la recuperación. Incluso las temperaturas de conservación en nitrógeno líquido a cifras que alcanzan los  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  son métodos de referencia no solo de bacterias si no de células y tejidos eucariotas. (9)

El ritmo al que se llega a esta temperatura, los expertos en la materia sugieren un ritmo de enfriamiento de  $5$  a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  por minuto, velocidades mayores implican la formación de cristales de hielo excesivamente grandes y numerosos produciendo rupturas celulares, un cambio demasiado lento generaría deshidratación celular y por ende la muerte de las bacterias además de que reducir la velocidad del proceso incrementa su complejidad técnica y su costo. (9)

Como último paso se requiere la recuperación de los microorganismos que se conservaron previamente, lo que se logra mediante la descongelación, lo más recomendable es que se realice al mismo ritmo al proceso de congelación, para después colocar lo antes posible en un medio rico en nutrientes que optimice la reproducción de los mismos. La cuantificación de estos solo es necesaria cuando se evalúa la eficiencia de un nuevo método. (10)

Durante el desarrollo de todas estas técnicas se debe tener especial precaución de los distintos detalles que permiten que las cepas permanezcan puras, se deben mantener las condiciones de esterilidad de los materiales y las instalaciones, así como los controles necesarios para demostrarla. Evitar por ende la contaminación por otros organismos sin importar su procedencia.

El objetivo principal del cepario de FES Zaragoza es conservar microorganismos viables que sean útiles para que los alumnos aprendan acerca de su complejo comportamiento.

Un ficha de identificación bacteriana es un documento que se brinda con una cepa certificada en la que se incluye la taxonomía completa de la misma, así como su designación alfanumérica para la colección que la provee, contiene información de la fuente de donde fue obtenida, y las características genéticas y fenotípicas de la misma, es decir un esquema de identificación completo. (10,3).

#### Antecedentes de los microorganismos utilizados

a) *Streptococcus pyogenes*: Estreptococo beta-hemolítico piogénico del grupo A de Lancefield suele encontrarse en cadenas o pares con un metabolismo fermentativo aerotolerante. Causante de infecciones supurativas principalmente en vías aéreas y mucosas, así como de secuelas no supurativas por producción cruzada de anticuerpos. Presenta colonias comúnmente lustrosas aquellas que son virulentas (formación de cápsula).



- b) *Streptococcus bovis*: Estreptococo no piogénico, del grupo D de Lancefield, causante de infecciones en piel y mucosas así como una amplia gama de infecciones oportunistas, metabolismo fermentativo, no móvil, no hemolítico, suele ser parte de la flora normal de mamíferos rumiantes, ligeramente capnófilo.
- c) *Streptococcus pneumoniae*: Estreptococo Gram (+) de forma ligeramente oval con extremo lanceolado, perteneciente al grupo D de Lancefield, capnófila de colonias umbilicadas a las 48 h causante de infecciones en vías respiratorias así como de procesos invasivos severos.
- d) *Streptococcus agalactiae*: Estreptococo encapsulado del grupo B de Lancefield presenta infecciones de tipo oportunista en el tracto respiratorio y ocasionalmente en el sistema nervioso central, causa importante de infecciones posparto tanto en la madre como en el producto, agrupaciones en cadenas Gram (+), de metabolismo fermentativo.
- e) *Neisseria lactamica*: Diplococos arriñonados Gram (-) comúnmente dispuestos en pares, no suele ser patógena, cuando lo es causa meningitis o endocarditis, capnófilo, de metabolismo fermentativo para lactosa.
- f) *Streptococcus mutans*: Estreptococo de clasificación oral, no perteneciente a un grupo de Lancefield, causante de endocarditis y principal agente causal de la caries dental dada su alta capacidad para producir ácido a partir de casi cualquier carbohidrato y su capacidad de adherencia.
- g) *Gardnerella vaginalis*: Bacilos pleomórficos Gram (+) y (-) catalasa (-) no encapsulados, principal causa de vaginosis bacteriana, capnófilos, metabolismo fermentativo, oxidasa (-), productores de aminas detectables por su aroma como la putrescina.
- h) *Streptococcus mitis*: Estreptococo Gram (+) no perteneciente a ningún grupo de Lancefield de metabolismo fermentativo principal productor de endocarditis bacteriana sobre válvula natural.
- i) *Haemophilus influenzae*: Células con marcado pleomorfismo, encapsulado, capnófilo causa importante de meningitis en niños, las colonias con olor característico a “nidial de ratones”.
- j) *Staphylococcus epidermidis*: Parte de la flora normal del ser humano, presente principalmente en piel y mucosas, asociado a infecciones oportunistas principalmente de tipo nosocomial en heridas quirúrgicas y catéteres, ligeramente halófilo.
- k) *Staphylococcus aureus*: Cocos Gram (+) agrupados en racimos, suele causar infecciones en piel y apéndices, incluso infecciones generalizadas, patógenos muy comunes, altamente oportunistas, halófilos.



- l) *Pseudomonas aeruginosa*: Bacilos Gram (-) rectos o ligeramente curvos causantes de una amplia gama de infecciones en el ser humano desde foliculitis hasta sepsis, básicamente puede colonizar a cualquier zona del organismo. No exigente en sus requerimientos nutricionales, aerobio estricto, de metabolismo oxidativo para glucosa.
- m) *Acinetobacter baumannii*: Bacilo Gram (-) difícil de decolorar, dispuesto en pares, de metabolismo oxidativo, suele causar infecciones principalmente oportunistas de tipo nosocomial, clínicamente relevante por la resistencia a antimicrobianos, capaz de sobrevivir largos periodos en el ambiente.
- n) *Escherichia coli*: Bacilo Gram (-) de metabolismo fermentativo parte de la flora intestinal humana, sin embargo existen serogrupos causantes de infecciones intestinales y extraintestinales de cuadros que llegan a ser severos, es el microorganismo más común causante de infecciones urinarias.
- o) *Klebsiella pneumoniae*: Bacilo Gram (-) encapsulado fermentador de lactosa patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas causante de infecciones comúnmente hospitalarias en sistema respiratorio y urinario en algunas ocasiones.
- p) *Proteus mirabilis*: Especie de la familia de las enterobacterias, altamente móvil, suele causar infecciones urinarias y cutáneas, así como ocasionalmente septicemias en pacientes inmunocomprometidos, suele caracterizarse por el fenómeno de swarming en los cultivos.
- q) *Candida albicans*: Hongo levaduriforme principal causa de infecciones oportunistas causadas por el reino fungi, parte de la flora normal en mucosas, especialmente vaginal y bucal.
- r) *Moraxella catarrhalis*: Bacilo Gram (-) aerobio, pleomórfico, recuerda al género *Neisseria* no utiliza la glucosa, causante de infecciones oportunistas en nasofaringe y oído con riesgo de complicaciones sistémicas.
- s) *Enterobacter hormaechei*: Bacilos Gram (-) rectos anaerobios facultativos de metabolismo fermentativo causante de pocas infecciones de tipo intra y extra hospitalarios poco estudiado como tal ya que se suele confundir con *E. cloacae*.
- t) *Enterococcus faecalis*: cocos Gram (+) dispuestos en pares o en cadenas cortas pertenecientes al grupo D de Lancefield, halófilos de metabolismo fermentativo. Presentes en la microbiota de seres humanos, animales y el medio ambiente en general, junto con *E. faecium* forman el 95% de la flora intestinal humana, causante de infecciones intestinales, bacteriemias generalizadas e infecciones urinarias intrahospitalarias.



- u) *Salmonella enterica subs. enterica serovar typhi*: Bacilo Gram (-) no fermentativo para lactosa, no capsulado, flagelado, aeróbico causante de salmonelosis y de fiebre tifoidea así como infecciones extraintestinales.
- v) *Stenotrophomonas maltophilia*: Bacilos Gram (-) aerobios de metabolismo oxidativo, no suelen ser patógenos a excepción de pacientes inmunocomprometidos especialmente de tipo intrahospitalario, colonias con olor característico a amoníaco.
- w) *Shigella flexneri*: Bacilos Gram (-) anaerobios facultativos, inmóviles, agente causal de shigelosis intestinal.
- x) *Mycobacterium spp.*: Bacilos aerobios difícilmente teñibles por Gram pero se consideran Gram (+), presentan alcohol-ácido resistencia, son una rama de estudio apartada de la bacteriología dadas sus características bioquímicas y fisiológicas, agentes causales de enfermedades como lepra o tuberculosis.



## **Planteamiento del problema**

El cepario de FES Zaragoza se conserva por el método tradicional de resiembra periódica lo que genera pérdidas continuas de los cultivos y mutaciones fenotípicamente notables en las pruebas realizadas por los alumnos.

Se pretende que el documento a generar en este proyecto represente un catálogo para la conservación de las cepas bacterianas disponibles en la FES Zaragoza, ya que algunas de ellas son de metabolismo exigente por lo que la criopreservación debe ser llevada a cabo bajo condiciones especiales, pretende ser una guía que proporcione información para mantener de manera óptima al cepario. Por lo que en los apartados se incluyen: el medio de cultivo utilizado así como la temperatura a la que se recomienda para su conservación. En la parte experimental de este proyecto se obtuvo la recuperación y el tiempo al que fueron sometidas. De igual manera proveer de información suficiente para realizar una identificación adecuada por métodos bioquímicos facilitando de esta manera el trabajo de alumnos y profesores.



## Objetivos

### *A. Generales*

Elaborar un anexo a los manuales de Microbiología General I y de Microbiología Médica de la carrera de QFB incluyendo las pruebas más concluyentes de identificación así como el método más conveniente de conservación de los ejemplares del cepario de FES Zaragoza

Realizar las pruebas de identificación más importantes para las especies pertenecientes al cepario de FES Zaragoza.

Proponer un medio de criopreservación para el cepario de la FES Zaragoza.

### *B. Particulares*

Realizar una investigación bibliográfica acerca de las cepas evaluadas en los laboratorios de microbiología y del comportamiento metabólico de dichas especies.

Realizar una investigación bibliográfica acerca de los métodos de conservación mas utilizados en institutos y colecciones internacionales para las bacterias.

Formular un medio de cultivo que sea económico para la criopreservación de las cepas bacterianas.

Corroborar el comportamiento metabólico de las especies bacterianas después de su proceso de conservación demostrando la ausencia de mutaciones fenotípicamente importantes.



## Hipótesis

Las cepas bacterianas del cepario de FES Zaragoza criopreservadas en un medio de cultivo leche-glicerol permanecerán en óptimas condiciones para su subcultivo posterior manteniendo sus características metabólicas originales.

## Diseño experimental

*Tipo de estudio:* prospectivo, longitudinal

*Población de estudio:* cepas bacterianas del cepario en laboratorio de producción y microbiología de la FES Zaragoza.

*Criterios de inclusión, exclusión y eliminación:* se incluirán todas aquellas especies que aun conserven las características fenotípicas que se reportan en la literatura, quedaran excluidas aquellas que no las conserven, aquellas que no presenten crecimiento en un medio de propagación (BHI suplementado con sangre de carnero) a las 48 horas y serán eliminadas del estudio aquellas que presenten divergencia en la morfología colonial en su resiembra posconservación.

*Variables:*

- Independientes: temperatura de conservación, medios de cultivo de propagación e identificación, atmosfera de cultivo, temperatura de resiembra, tiempo de congelación, velocidad de congelación y descongelación.
- Dependientes: morfología colonial, morfología microscópica, comportamiento bioquímico.

*Materiales y métodos:*

Reactivos, medios de cultivo y colorantes:

Leche en polvo descremada marca Svelty's	Agar urea de Christensen
Glicerol	Agar Columbia
Agar gelosa chocolate	Agar Sal y Manitol
Medio de cultivo caldo BHI	Caldo base rojo de fenol
Sangre de carnero desfibrinada	Glucosa
Agua bidestilada	Lactosa
Plasma humano	Rafinosa
Agar citrato de Simmons	Maltosa
Medio O/F Glucosa Hugh-Leifson	Salicina
Aceite mineral	Trehalosa
Medio de cultivo rojo de metilo-Voges Proskauer	Manosa
Agar fenilalanina	Manitol
	Sorbitol
	FeCl <sub>3</sub>



$\alpha$ -Naftilamina  
KOH  
Resina Entellan  
Xilol

Violeta de Genciana  
Safranina  
Yodo lugol  
Alcohol-acetona

**Material:**

Portaobjetos y cubreobjetos  
Mechero de Bunsen  
Pipeta semiautomática de 500  $\mu$ L  
Asas bacteriológicas  
Viales para criopreservación  
Gradilla para crioviales  
Jarra de anaerobiosis  
Gradilla para tubos 25 x 150 mm  
Cámara de Neubauer

Tubos de ensayo 25 x 150 mm  
tapón de rosca  
Cajas petri 100 mm de diámetro  
Probetas de 50 mL, 100 mL y 500 mL  
Espátula  
Termómetro  
Tubos de ensayo 13 x 100 mm  
Matraz Erlenmeyer 500 mL  
Tubos de ensayo 18 x 150 mm

**Equipo:**

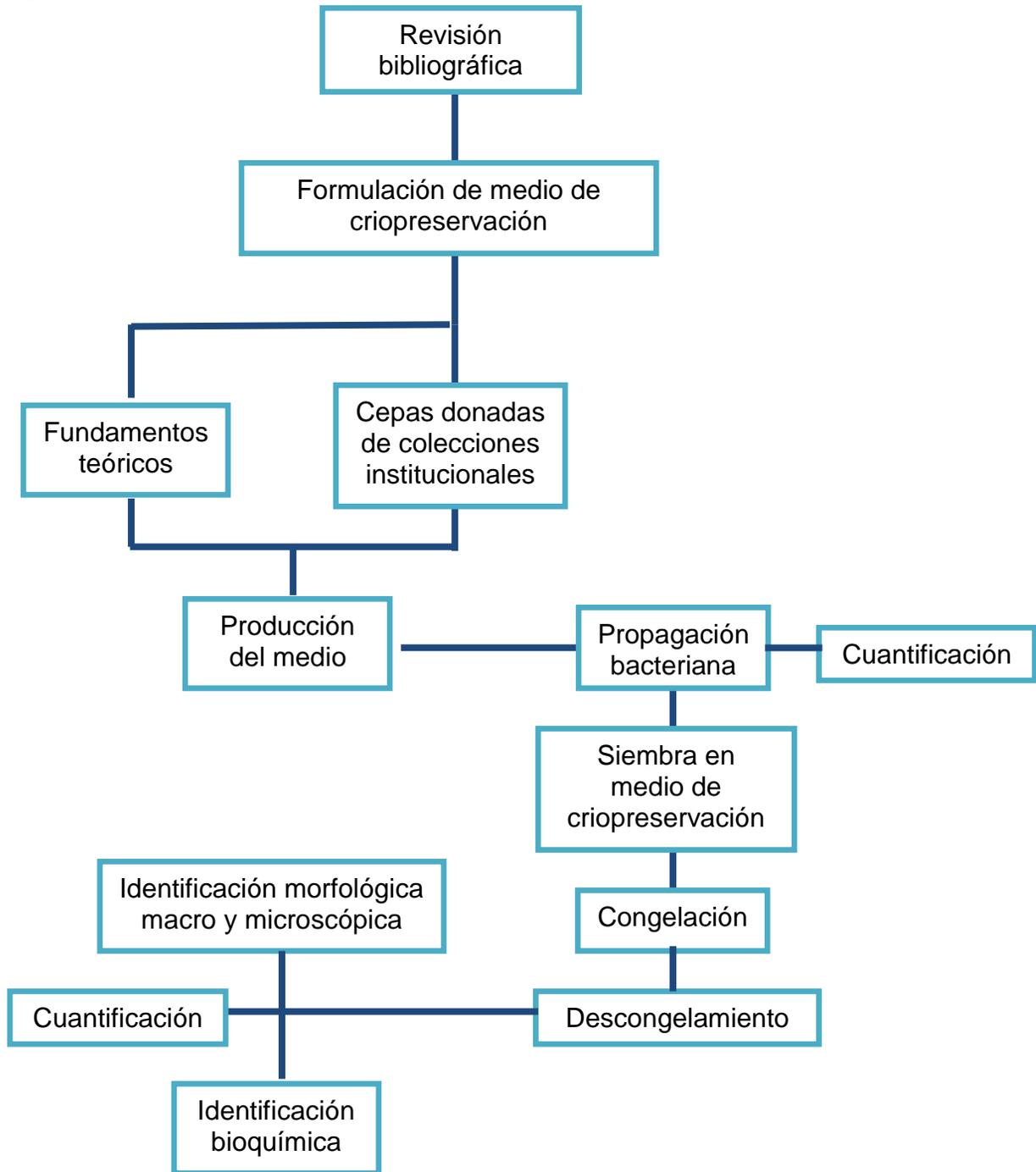
Microscopio óptico con objetivos de 40x y 100x  
Autoclave vertical  
Balanza granataria  
Ultracongelador

**Método**

Las cepas de estudio fueron sometidas a cultivo en medio enriquecido infusión cerebro corazón con sangre desfibrinada de carnero al 5% durante 24 h, de igual manera se prepararon frotis, se tiñeron por el método de Gram y se fijaron en resina, posteriormente fueron cuantificadas por un método directo de cuenta en cámara de Neubauer, para ser transferidas a un medio de leche descremada 30% glicerol 10% esterilizada a 12 PSI durante 15 minutos



### Diagrama de flujo





## Resultados

El periodo de análisis fue de un año, por cada especie estudiada se generaron 10 crioviales que se conservaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de igual manera una laminilla teñida por el método de Gram y fijada con resina Entellan, cada cepa bacteriana fue identificada por la pruebas bioquímicas mas características reportadas por Mac Faddin. (3)

En las siguientes páginas se describe el apartado arriba mencionado con las fichas de identificación necesarias de cada microorganismo para conformar el catálogo de FES Zaragoza

Se conservaron las cepas en medio de leche glicerolada al 10%, al finalizar el periodo de congelación, fueron cuantificadas nuevamente por cuenta directa en cámara de Neubauer, y se corroboraron las pruebas de identificación, de manera que se comprobara que el comportamiento bioquímico seguía siendo el mismo antes y después de la conservación.

Todas las cepas se recuperaron con éxito, obteniendo rendimientos de 80% o mayores, incluso para las micobacterias y la cepa levaduriforme sometidas al proceso.



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**  
**Química Farmacéutica Biológica**



Catálogo de fichas de identificación del cepario de FES Zaragoza.

**Autor: SILVA DOMÍNGUEZ MANUEL JESÚS**

**ÁREA ESPECÍFICA DEL PROYECTO:** Microbiología Médica

**NOMBRE DEL DIRECTOR:** Q.F.B. Patricia Vidal Millán

**LUGAR EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO:** Laboratorio de Producción y Microbiología L-205 Campus I de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Streptococcus pyogenes</i></b>
<b>Número ATCC</b>	No determinado
<b>Descripción</b>	<p>Estreptococo beta-hemolítico piogénico del grupo A de Lancefield suele encontrarse en cadenas o pares con un metabolismo fermentativo aerotolerante.</p> <p>Causante de infecciones supurativas principalmente en vías aéreas y mucosas, así como de secuelas no supurativas por producción cruzada de anticuerpos.</p> <p>Presenta colonias comúnmente lustrosas aquellas que son virulentas (formación de cápsula).</p>
<b>Medio de propagación</b>	<p>Agar BHI</p> <p>Agar soya tripticasa</p> <p>Agar nutritivo</p> <p>Caldo Todd-Hewitt</p>
<b>Medio diferencial</b>	<p>Agar sangre de carnero 5% (hemólisis beta)</p> <p>Agar bilis-esculina</p> <p>Agar sangre con azida de sodio</p> <p>Agar cistina tripticasa</p> <p>Agar Columbia CNA</p>
<b>Medio de conservación</b>	<p>Agar cistina tripticasa</p> <p>Leche descremada al 5%</p> <p>Liofilización</p> <p>Medio de Todd-Hewitt-Glicerol</p> <p>Leche descremada 15% glicerol 5%</p>
<b>Método de eliminación</b>	<p>Incineración</p> <p>Esterilización húmeda</p>
<b>Pruebas de identificación</b>	<p>Producción de ácido a partir de lactosa, salicina y trehalosa</p> <p>Resistente a la optoquina</p> <p>Sensible a la bacitracina</p>
<b>Temperatura de incubación</b>	37 °C rango 22-45 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



Microorganismo	<i>Streptococcus gallolyticus</i>
Número ATCC	9809
Descripción	Estreptococo no piogénico, del grupo D de Lancefield, causante de infecciones en piel y mucosas así como una amplia gama de infecciones oportunistas, metabolismo fermentativo, no móvil, no hemolítico, suele ser parte de la flora normal de mamíferos en el tracto gastrointestinal, al perderse la continuidad de la mucosa produce sepsis de recuperación rápida, ligeramente capnófilo, sumamente relacionado al cáncer de colon. Anteriormente llamado <i>S. bovis</i> , desde 2003 su taxonomía ha cambiado.
Medio de propagación	Agar BHI Agar sangre de carnero 5% Agar chocolate Agar sangre TSA Agar sangre CNA Caldo SF
Medio diferencial	Agar sangre de carnero 5% (hemólisis alfa débil) Bio-streptosel Agar CLED
Medio de conservación	Leche descremada al 5% Liofilización Medio de Todd-Hewitt-Glicerol Leche descremada 15% glicerol 5%
Método de eliminación	Incineración Esterilización húmeda
Pruebas de identificación	Crecimiento en bilis al 40% Producción de ácido a partir de lactosa y salicina Voges Proskauer + Bilis-esculina + PYR – NaCl al 6.5% -
Temperatura de incubación	37 °C
Temperatura de conservación	-70 °C
Tiempo de incubación	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Streptococcus pneumoniae</i></b>
<b>Número ATCC</b>	49619
<b>Descripción</b>	Estreptococo Gram (+) de forma ligeramente oval con extremos lanceolados, perteneciente al grupo D de Lancefield, capnófila de colonias umbilicadas a las 48h, causante de infecciones de vías respiratorias así como de procesos invasivos severos. Aislado por primera vez del esputo de un varón de 75 años de edad en Phoenix Arizona.
<b>Medio de propagación</b>	Agar BHI Agar soya tripticasa Agar sangre de carnero 5% Agar chocolate
<b>Medio diferencial</b>	Agar sangre de carnero 5% (hemólisis alfa)
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada al 5% (poca supervivencia) Sangre de carnero 5% Leche descremada 15% glicerol 5% sangre de carnero 2.5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Producción de ácido a partir de lactosa, rafinosa y trehalosa Soluble en bilis Sensible a la optoquina
<b>Temperatura de incubación</b>	37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h

Esta cepa tuvo que ser incubada en medio BHI suplementado con sangre de carnero durante 24 hrs. para su conservación.



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Neisseria lactamica</i></b>
<b>Número ATCC</b>	49142
<b>Descripción</b>	Diplococos arriñonados Gram (-) comúnmente dispuestos en pares, no suele ser patógena, cuando lo es causa sepsis, meningitis o endocarditis, capnófilo, de metabolismo fermentativo para lactosa, con exigentes requerimientos para su propagación. Procedente de un aislamiento clínico.
<b>Medio de propagación</b>	Agar BHI Agar chocolate
<b>Medio diferencial</b>	Agar Thayer-Martin Agar Martin-Lewis Agar NYC
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada al 5% (poca supervivencia) Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Catalasa (+) Oxidasa (+) Producción de ácido a partir de lactosa
<b>Temperatura de incubación</b>	35-37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h

Esta cepa tuvo que ser desarrollada en medio de cultivo Thayer Martin durante 24 horas en condiciones de capnofilia.



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Streptococcus mutans</i></b>
<b>Número ATCC</b>	No determinado
<b>Descripción</b>	Estreptococo de clasificación oral, no perteneciente a ningún grupo de Lancefield, causante de endocarditis y principal agente causal de la caries dental dada su alta capacidad para producir ácido a partir de casi cualquier carbohidrato y su capacidad de adherencia.
<b>Medio de propagación</b>	Agar BHI Agar soya tripticasa Agar nutritivo
<b>Medio diferencial</b>	Agar sangre de carnero 5% (hemólisis gamma)
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Crecimiento en bilis al 40% Hidrólisis de la esculina (+) Voges-Proskauer (+) Resistente a optoquina y bacitracina
<b>Temperatura de incubación</b>	37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Gardnerella vaginalis</i></b>
<b>Número ATCC</b>	14018
<b>Descripción</b>	Bacilos pleomórficos Gram (+) catalasa (-) no encapsulados, principal causa de vaginosis bacteriana, capnófilo, metabolismo fermentativo, oxidasa (-) productores de aminas detectables por su aroma como la putrescina, aislada de secreciones vaginales.
<b>Medio de propagación</b>	Agar sangre humana 5% Agar sangre de caballo descomplementada Caldo Casman
<b>Medio diferencial</b>	Agar sangre humana 5% (hemólisis beta) Agar Gardenerella
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Hidrólisis del hipurato (+) Hidrólisis del almidón (+) Rojo de metilo (+) Prueba de KOH (+)
<b>Temperatura de incubación</b>	35-37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	48 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Streptococcus oralis</i></b>
<b>Número ATCC</b>	9811
<b>Descripción</b>	Estreptococo no perteneciente a ningún grupo de Lancefield, Gram (+) de metabolismo fermentativo principal productor de endocarditis bacteriana sobre válvula natural.
<b>Medio de propagación</b>	Agar BHI Agar soya tripticasa Agar nutritivo
<b>Medio diferencial</b>	Agar sangre de carnero 5% (hemólisis alfa) Agar cisteína-telurito (colonias negras)
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada al 20% Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Crecimiento a 10 °C No produce ácido a partir de lactosa, pero sí de manitol
<b>Temperatura de incubación</b>	37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Haemophilus influenzae</i></b>
<b>Número ATCC</b>	49766/49247/10211
<b>Descripción</b>	Células con marcado pleomorfismo, encapsulado, capnófilo causa importante de meningitis en niños, las colonias con olor característico a “nidial de ratones”.con aspecto de gotas de rocío sobre el agar. La cepa ATCC 49766 aislado de un absceso pulmonar de un paciente de 57 años; la cepa ATCC 49247 obtenido del esputo de un varón de 76 años con neumonía en Worcester Massachusetts; la cepa ATCC 10211 proviene de la colección de personal de Walter Reed del Army Medical Center.
<b>Medio de propagación</b>	Agar chocolate Agar NC
<b>Medio diferencial</b>	Agar chocolate Agar NC
<b>Medio de conservación</b>	No resistente a condiciones adversas Liofilización Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Catalasa (+) Oxidasa (+) Requerimiento de factor V y X Prueba de satelitismo (+)
<b>Temperatura de incubación</b>	35-37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	24-72 h en atmosfera con 5% de CO <sub>2</sub>



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>
<b>Número ATCC</b>	35984
<b>Descripción</b>	Parte de la flora normal del ser humano, presente principalmente en piel y mucosas, asociado a infecciones oportunistas principalmente de tipo nosocomial en heridas quirúrgicas y catéteres, ligeramente halófilo. Agente causal de colonización sobre válvula prostética, aislado de un catéter colonizado.
<b>Medio de propagación</b>	Agar BHI Agar soya tripticasa Agar nutritivo
<b>Medio diferencial</b>	Agar sangre de carnero 5% (hemólisis beta) Agar S-110 Agar sal y manitol (colonias rosadas)
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada al 20% Liofilización Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Catalasa (+) Crecimiento en anaerobiosis Producción de ácido a partir de maltosa y sacarosa Voges-Proskauer (+) Coagulasa (-)
<b>Temperatura de incubación</b>	35-37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>
<b>Número ATCC</b>	33862/25923/43300/29213
<b>Descripción</b>	Cocos Gram (+) agrupados en racimos, suele causar infecciones en piel y apéndices, incluso infecciones generalizadas, patógenos muy comunes, altamente oportunistas, halófilos. De metabolismo fermentativo. Distribuidos a nivel mundial, causa de infecciones relacionadas con el puerperio y el parto, en los últimos años ha atrapado el interés de los investigadores por su resistencia a los antimicrobianos.
<b>Medio de propagación</b>	Agar BHI Agar soya tripticasa Agar nutritivo
<b>Medio diferencial</b>	Agar sangre de carnero 5% (hemólisis beta) Agar S-110 (colonias pigmentadas) Agar sal y manitol (colonias amarillas)
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada al 20% Liofilización Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Coagulasa (+) Hialuronidasa (+) Voges-Proskauer (+) Resistente a la polimixina B
<b>Temperatura de incubación</b>	35-37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>
<b>Número ATCC</b>	27853
<b>Descripción</b>	Bacilos Gram (-) rectos o ligeramente curvos causantes de una amplia gama de infecciones en el ser humano desde foliculitis hasta sepsis, básicamente puede colonizar cualquier zona del organismo. No exigente en sus requerimientos nutricionales, aerobio estricto, de metabolismo oxidativo para glucosa, con olor característico a "nixtamal", colonizador de superficies y organismos, recuperado de un hemocultivo.
<b>Medio de propagación</b>	Agar BHI Agar soya tripticasa Agar sangre de carnero 5% Agar nutritivo
<b>Medio diferencial</b>	Agar P (colonias verdes) Agar cetrimida Agar Mac Conkey Agar sangre de carnero 5% (colonias color verde metálico) Agar CPS ID2 biomérieux (colonias verdes)
<b>Medio de conservación</b>	TSB y glicerol al 20% Liofilización Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Catalasa (+) Oxidasa (+) Licuefacción de la gelatina (+) Lipasa (+) Crecimiento a 41°C Citrato (+)
<b>Temperatura de incubación</b>	30-37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Acinetobacter baumannii</i></b>
<b>Número ATCC</b>	No determinado
<b>Descripción</b>	Bacilo Gram (-) difícil de decolorar, dispuesto en pares, de metabolismo oxidativo, suele causar infecciones principalmente oportunistas de tipo nosocomial, clínicamente relevante por la resistencia a antimicrobianos, capaz de sobrevivir largos periodos en el ambiente.
<b>Medio de propagación</b>	Agar Mac Conkey Agar Columbia Agar Columbia y sangre de carnero 5%
<b>Medio diferencial</b>	Agar Herellea Agar Holton's Agar Leeds Acinetobacter
<b>Medio de conservación</b>	Caldo soya-tripticosa glicerol 15% Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Catalasa (+) Oxidasa (-) Crecimiento a 41 °C Citrato (+) Lisina descarboxilasa (-)
<b>Temperatura de incubación</b>	33-35 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>
<b>Número ATCC</b>	35218/25922
<b>Descripción</b>	Bacilo Gram (-) de metabolismo fermentativo parte de la flora intestinal humana, sin embargo existen serogrupos causantes de infecciones intestinales y extraintestinales de cuadros que llegan a ser severos, es el microorganismo mas común causante de infecciones urinarias; la cepa ATCC 35218 aislada de una muestra canina de Tennessee; y la cepa 25922 es un aislamiento clínico, usado como modelo de susceptibilidad antimicrobiana de Gram (-).
<b>Medio de propagación</b>	Agar sangre de carnero 5% Agar BHI Agar soya tripticasa Agar nutritivo
<b>Medio diferencial</b>	Agar eosina- azul de metileno (colonias brillo verde metálico) Agar Mac Conkey (colonias rosadas) CPS ID2 de biomérieux (colonias rojas)
<b>Medio de conservación</b>	Caldo soya tripticasa DMSO leche descremada-glucosa Leche descremada Glicerol 15% Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	KIA ácido/ácido Indol (+) Rojo de metilo (+) Voges-Proskauer (-) Citrato (-)
<b>Temperatura de incubación</b>	37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>
<b>Número ATCC</b>	13883
<b>Descripción</b>	Bacilo Gram (-) encapsulado, fermentador de lactosa, patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas causante de infecciones principalmente hospitalarias en sistema respiratorio y urinario en algunas ocasiones, perteneciente también a la colección NCTC, utilizado para investigaciones genéticas y de adhesión bacteriana.
<b>Medio de propagación</b>	Agar sangre de carnero 5% Agar soya tripticasa Agar nutritivo
<b>Medio diferencial</b>	Agar eosina azul de metileno Agar Mac Conkey (colonias rosadas)
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada 20% Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Indol (-) Rojo de metilo (-) Voges-Proskauer (+) Citrato (+) Motilidad (-) Oxidasa (+)
<b>Temperatura de incubación</b>	37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<i>Proteus mirabilis</i>
<b>Número ATCC</b>	7002
<b>Descripción</b>	Especie de la familia de las enterobacterias, altamente móvil, suele causar infecciones urinarias y cutáneas, así como ocasionalmente septicemias en pacientes inmuno comprometidos, suele caracterizarse por el fenómeno de swarming en los cultivos, aislado por primera vez de una muestra de orina de un paciente con cálculos biliares.
<b>Medio de propagación</b>	Agar sangre de carnero 5% Agar verde brillante Agar Mac Conkey (colonias incoloras)
<b>Medio diferencial</b>	Agar verde brillante Agar desoxicolato-citrato Agar sulfito de bismuto (colonias cafés) CPS ID2 de biomérieux (colonias cafés) Agar CLED
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada 20% Liofilización Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	KIA alcalino/ ácido H <sub>2</sub> S Rojo de metilo (+) Ornitina descarboxilasa (+) Ureasa (+) Fenilalanina desaminasa (+) Licuefacción de la gelatina (+) Voges-Proskauer (-)
<b>Temperatura de incubación</b>	37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	16-22 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Candida albicans</i></b>
<b>Número ATCC</b>	14053
<b>Descripción</b>	Hongo levaduriforme principal causa de infecciones oportunistas causadas por el reino fungi, parte de la flora normal en mucosas, especialmente vaginal y bucal, obtenido de sangre humana en Bethesda MD.
<b>Medio de propagación</b>	Agar Saburoard Agar Byggy Agar sangre de carnero 5%
<b>Medio diferencial</b>	Chromagar Candida (colonias verdes) Agar harina de maíz (clamidosporas) Agar papa-zanahoria-bilis
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada al 20% Agar PDA Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Formación de tubo germinativo Formación de clamidosporas
<b>Temperatura de incubación</b>	28-37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Moraxella catarrhalis</i></b>
<b>Número ATCC</b>	49143
<b>Descripción</b>	Bacilo Gram (-) aerobio, pleomórfico, recuerda al género <i>Neisseria</i> no utiliza la glucosa, no suele crecer en agar Mac Conkey, causante de infecciones oportunistas en nasofaringe y oído con riesgo de complicaciones sistémicas. Obtenida de un aislamiento clínico y conservada por Baxter Healthcare Corporation.
<b>Medio de propagación</b>	Agar sangre de carnero 5% Agar chocolate
<b>Medio diferencial</b>	Agar NYC Agar Thayer-Martin con vancomicina
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada al 20% Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Catalasa (+) Oxidasa (+) Reducción de nitratos (+) O/F glucosa NF
<b>Temperatura de incubación</b>	33-35 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Enterobacter hormaechei</i></b>
<b>Número ATCC</b>	700323
<b>Descripción</b>	Bacilos Gram (-) rectos anaerobios facultativos de metabolismo fermentativo causante de pocas infecciones de tipo intra y extra hospitalarios poco estudiado como tal ya que se suele confundir con <i>E. cloacae</i> , aerobia estricta, conservada por bioMerieuxVitek.
<b>Medio de propagación</b>	Agar Mac Conkey Agar nutritivo Agar soya tripticasa
<b>Medio diferencial</b>	Agar cloruro de tetrazolio (colonias rosadas) Agar extracto de levadura dextrosa, carbonato de calcio (colonias cremosas) Medio Miller-Schroth (colonias naranjas)
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada al 20% Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	KIA alcalino/acido Rojo de metilo (+) Indol (-) Voges-Proskauer (+) Citrato (+) Ornitina descarboxilasa (+) Malonato (+) Ureasa (+) Producción de ácido a partir de lactosa y sorbitol pero no de rafinosa Se diferencia de <i>E. cloacae</i> por la prueba de 3-hidroxi-butirato (+)
<b>Temperatura de incubación</b>	37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>
<b>Número ATCC</b>	29212/51299
<b>Descripción</b>	<p>Cocos Gram (+) dispuestos en pares o en cadenas cortas pertenecientes al grupo D de Lancefield, halófilos de metabolismo fermentativo.</p> <p>Presentes en la microbiota de seres humanos, animales y el medio ambiente en general, junto con <i>E. faecium</i> forman el 95% de la flora intestinal humana, causante de infecciones intestinales bacteriemias generalizadas e infecciones urinarias intrahospitalarias. La cepa ATCC 29212 fue obtenida de una muestra de orina y es conservada por Micro-Media Systems Inc.; la cepa ATCC 51299 obtenida del líquido peritoneal de un paciente en San Louis Missouri, ligeramente resistente a vancomicina, lo que lo coloca en nivel de bioseguridad 2.</p>
<b>Medio de propagación</b>	<p>Agar BHI</p> <p>Agar soya tripticasa</p> <p>Agar nutritivo</p>
<b>Medio diferencial</b>	<p>Agar bilis esculina</p> <p>CPS ID2 de biomérieux (colonias azules pequeñas)</p> <p>Medio hipertónico para enterococos (colonias amarillas)</p> <p>Agar telurito (colonias negras)</p>
<b>Medio de conservación</b>	<p>Leche descremada al 20%</p> <p>Leche descremada 15% glicerol 5%</p>
<b>Método de eliminación</b>	<p>Incineración</p> <p>Esterilización húmeda</p>
<b>Pruebas de identificación</b>	<p>Crecimiento a 10 °C</p> <p>Producción de ácido a partir de manitol y arginina pero no de sorbosa</p> <p>PYR (+)</p> <p>Reducción de leche tornasol</p>
<b>Temperatura de incubación</b>	37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Salmonella enterica subsp enterica serovar tiphy</i></b>
<b>Número ATCC</b>	19430
<b>Descripción</b>	Bacilo Gram (-) no fermentativo para lactosa, flagelado, aeróbico causante de salmonelosis y de fiebre tifoidea así como infecciones extraintestinales, perteneciente a la NCTC, utilizado para pruebas genéticas dados sus factores de virulencia.
<b>Medio de propagación</b>	Agar BHI Agar soya tripticasa Caldo selenito F
<b>Medio diferencial</b>	Agar Mac Conkey Agar Salmonella- Shigella Agar rojo violeta-bilis Agar sulfito de bismuto
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada al 20% Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	KIA alcalino/acido producción de H <sub>2</sub> S Rojo de metilo (+) Indol (-) Voges-Proskauer (-) Citrato (-) Lisina descarboxilasa (+) Producción de ácido a partir de manitol y sorbitol
<b>Temperatura de incubación</b>	35-37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>
<b>Número ATCC</b>	17666
<b>Descripción</b>	Bacilos Gram (-) aerobios de metabolismo oxidativo, no suelen ser patógenos a excepción de pacientes inmuno comprometidos especialmente de tipo intrahospitalario, colonias con olor característico a amoníaco, aislado de un cultivo de tejidos contaminado, suele hallarse en hábitats acuáticos.
<b>Medio de propagación</b>	Agar soya tripticasa Agar nutritivo Agar BHI
<b>Medio diferencial</b>	Agar sangre de carnero 5% (colonias cafés, hemólisis gamma) Agar Mac Conkey (colonias incoloras)
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada al 20% Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Motilidad (+) Oxidasa (-) Licuefacción de la gelatina (+) Lisina descarboxilasa (+)
<b>Temperatura de incubación</b>	35-37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<i>Shigella flexneri</i>
<b>Número ATCC</b>	No determinado
<b>Descripción</b>	Bacilos Gram (-) anaerobios facultativos, inmóviles, agente causal de shigelosis intestinal.
<b>Medio de propagación</b>	Agar BHI Agar nutritivo Agar soya tripticasa
<b>Medio diferencial</b>	Agar SS (colonias transparentes) Agar XLD (colonias rojas) Agar Mac Conkey (colonias transparentes)
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada al 20% Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Oxidasa (-) Lisina descarboxilasa (-) Producción de ácido a partir de glucosa sin la producción de gas Citrato (-) KCN (-) Catalasa (+)
<b>Temperatura de incubación</b>	37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	18-24 h



<b>Microorganismo</b>	<b><i>Mycobacterium spp.</i></b>
<b>Número ATCC</b>	No determinado
<b>Descripción</b>	Bacilos aerobios difícilmente teñibles por Gram pero se consideran Gram (+), presentan alcohol-ácido resistencia, son una rama de estudio apartada de la bacteriología dadas sus características bioquímicas y fisiológicas, agentes causales de enfermedades como lepra o tuberculosis. Suelen clasificarse según su velocidad de crecimiento y la capacidad de producir pigmentos en distintas atmósferas.
<b>Medio de propagación</b>	Medio Lowenstein-Jensen Medio Coletsos
<b>Medio diferencial</b>	
<b>Medio de conservación</b>	Leche descremada al 20% Leche descremada 15% glicerol 5%
<b>Método de eliminación</b>	Incineración Esterilización húmeda
<b>Pruebas de identificación</b>	Reducción de nitratos (+) <i>M. tuberculosis</i> Catalasa a 68 °C (-) <i>M. tuberculosis</i>
<b>Temperatura de incubación</b>	37 °C
<b>Temperatura de conservación</b>	-70 °C
<b>Tiempo de incubación</b>	2-60 días



## Discusión de resultados

Las cepas conservadas durante una año demostraron tener una viabilidad similar a la reportada en los estudios de conservación investigados, en los institutos argentinos (32) y los reportados en España (25). Así como en las referencias cubanas (26,34), donde se considera un buen porcentaje de recuperación cuando la cifra es mayor al 70%.

Para la familia de las enterobacterias como en la descrita por Weng (26) la recuperación es apenas aceptable ya que en el medio semisólido evaluado se registra más de 85%.

Según las directrices de ATCC (39) y la UKNCC (35) es altamente recomendable que las cepas bacterianas que han sido recuperadas en mas del 70% sean resemebradas al pasar 24 meses a partir de la congelación inicial, demostrando que el método evaluado permitirá la mejor conservación del cepario en FES Zaragoza ya que la resiembra periódica requiere de atención de manera continua con resiembras semanales a como mayor lapso temporal.

El método mas adecuado para la conservación de un cepario según las entidades internacionales es la liofilización, desafortunadamente según las cotizaciones y limitaciones en tecnología de la Facultad e imposible lograr una técnica que requiere de equipo especial adicional al congelador requerido a -70 °C.

El catálogo obtenido de las pruebas de identificación y características de los microorganismos, así como la serie de laminillas fijas serán un apoyo para los recursos didácticos en clase para alumnos y profesores de las asignaturas de Microbiología General y Microbiología Médica.



## Referencias

- (1) Boone D Dastenholtz R, Carrity G. Bergey's of sistematic Bacteriology. Vol 1 2ª edición. New York, EU: Springer 2001.
- (2) Prescott CS. Industrial microbiology. Wesport, Connecticut: Avi Publishing Company Inc; 1982.
- (3) Mc Faddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, 3ª edición. Buenos Aires: editorial Panamericana; 2003.
- (4) Thoma RW, Benchmark. Paper in microbiology, industrial microbiology. Vol 12 Inc. Pennsylvania. USA: Editorial Dowden, Hutchinson & Ross; 1977.
- (5) Collins C métodos Microbiológicos. Zaragoza, España: Acribia; 1989.
- (6) Hunter CJ., Belt A. Maintaining cultures for biotechnology and industry. California, USA: Edit Academic Press; 1996.
- (7) Meryman HT. Cryoprotective agents. Cryobiology. 1971; 8: 137-138.
- (8) Forbes BA, Sahm DF, Weisfeld AS. Bailey & Scott. Diagnostico microbiológico. 3ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Panamericana; 2002.
- (9) Soriano AR. Implementación del método de conservación de bacterias por congelación a -20 °C. [Tesis Licenciatura]. México, D.F. UNAM; 2008.
- (10) Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. Diagnostico microbiológico. 3ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1992.
- (11) Smith D. Culture collections over the World. Inter microbiol. 2003.
- (12) Mindy JP, Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patogenos Bacterianos de Importancia para la Salud Publica en el Mundo en Desarrollo. Centro de recursos de la información, OMS, Suiza. 2004.
- (13) Sacaquispe CR. manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Ministerio de Salud. Lima, Perú. 2001.
- (14) Luyet BJ, Anatomy of the freezing process in physical systems, in Cryobiology, Academic Press, New York, USA. 1966.
- (15) Luyet BJ. Patterns of ice formation in some aqueous Solutions, Biodinamyca 8:1-68. 1958.
- (16) Alcaide FVF. Procedimientos en microbiología Clínica 9ª edición Micobacterias. Madrid, España 2005.
- (17) Mitchell RN. Compendio de Patología estructural y funcional. 7ª edición Elsevier Madrid, España 2007.
- (18) McPherson RA. Clyncial diagnosis and Managements for Laboratory Methods 21ª edición. Elsevier. USA 2007.
- (19) Geo FB. Medical Microbiology. 25ª edición Mc Graw Hill USA 2010.
- (20) Warren L. Review of Medical Microbiology and Inmunology. 10ª edición Mc Graw Hill USA 2008.
- (21) The Merck Manual. 10ª edición. Ediciones Harcourt. Madrid, España. 1999.
- (22) Shaechter M. The desk Enciclopedia of Microbiology. Elsevier. USA 2004.
- (23) Trivedi PC. Textbook of Microbiology. Asvishkar Publishers India 2010.
- (24) Miravet RM. Manual de técnicas microbiológicas para la evaluación de la calidad ambiental de ecosistemas marinos costeros. Honorable ayuntamiento del ministerio de solidaridad. Cuba. 2011.



- (25) Aznar J. Directrices para el envío de especímenes a los laboratorios clínicos para el diagnóstico biológico. Dirección general de asistencia sanitaria. Sevilla, España. 2009.
- (26) Weng AZ. Evaluación de medio semisólido para la conservación de microorganismos de la familia enterobacteriaceae. Revista cubana de medicina tropical. 2003; 55(3): 210-212.
- (27) Solomon HM. Media and reagents. En: Jackson GL., eds. 8ed. Bacteriological Analytical Manual. App. 3. Washington: US Food And Drug Administration; 1995.
- (28) Paaw A. *Enterobacter hormaechei* from isolate to epidemic [Tesis doctoral] Universidad Utrecht. Ámsterdam, Holanda. 2008.
- (29) Callejo RI. Curso teórico- práctico: identificación de bacilos Gram negativos no fermentadores. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Buenos Aires, Argentina 2010.
- (30) Ruiz ML. *Pseudomonas aeruginosa* aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. [tesis doctoral] Universidad de Barcelona. España 2007.
- (31) Weng AZ. Conservación bacteriana por método simple a temperatura ambiente: una alternativa viable. Revista Cubana de Higiene y epidemiología. 2005; 43(2).
- (32) Floccari M. Métodos de conservación de cultivos bacterianos. Rev Argentina microbiología 1998.
- (33) O'Hara CM. *Enterobacter hormaechei* a new species of the Family *Enterobacteriaceae* formerly known as Enteric Group 75. Journal of clinical microbiology. Washington. USA. 1989.
- (34) Arencibia ADF. Métodos de conservación de cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de AMES. Revista de toxicología. Habana, Cuba 2003 pág. 19-39.
- (35) Smith D. The UK National Culture Collection (UKNCC) Biological Resource: Properties Maintenance and Management. The UK National Culture Collection. Surrey UK. 2001.
- (36) Belmonte, A. Estudio de métodos por congelación para la conservación y mantenimiento de cepas de *Gardnerella vaginalis*. Bioquímica y Patología Clínica 2008, Vol. 72.
- (37) Zamora RLM. Aislamiento, identificación y conservación de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero [tesis doctoral] Universidad de Girona, España 2003.
- (38) Day JG, Cryopreservation and freeze-drying protocols. Humana Press, Totowa New Jersey, USA 1995.
- (39) Hatt H. American Type Culture Collection Methods: I. Laboratory manual on preservation, freezing and freeze-drying. American Type Culture Collection, Rockville USA. 1980.