



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO.

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS.

**Elaboración de un manual didáctico en línea, para la organización,
mantenimiento y preservación del cepario bacteriano del
Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Ciencias
Agrícolas.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO INDUSTRIAL**

P R E S E N T A:

**GARCÍA SÁNCHEZ TAMARA BETZABÉ
(Generación 44 y No. De cuenta 1311330)**

DIRECTORAS DE TESIS:

**Dra. en CARN. Ana Tarin Gutiérrez Ibáñez
Dra. en CARN. Rosa Laura Ocaña de Jesús.**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Enero de 2024.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO.
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS.



**Elaboración de un manual didáctico en línea, para la organización,
mantenimiento y preservación del cepario bacteriano del
Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Ciencias
Agrícolas.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO INDUSTRIAL**

P R E S E N T A:

GARCÍA SÁNCHEZ TAMARA BETZABÉ
(Generación 44 y No. De cuenta 1311330)

DIRECTORAS DE TESIS:

Dra. en CARN. Ana Tarin Gutiérrez Ibáñez
Dra. en CARN. Rosa Laura Ocaña de Jesús.

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Enero de 2024.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	3
II.	OBJETIVOS.....	5
2.1	Objetivo General.....	5
2.2	Objetivo Específico.....	5
III.	HIPÓTESIS.....	6
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	7
V.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
5.1	Origen y evolución de los microorganismos.....	8
5.2	Bacteria.....	8
5.2.1	Clasificación y nomenclatura.....	10
5.2.1.1	Manual de Bergey.....	12
5.2.2	Morfología colonial.....	14
5.2.3	Morfología bacteriana.....	17
5.2.4	Fisiología bacteriana.....	20
5.2.4.1	Estructura externa.....	21
5.2.4.2	Estructura interna.....	23
5.2.5	Requerimientos nutricionales.....	25
5.2.6	Reproducción bacteriana.....	26
5.3	Normas de bioseguridad en el laboratorio.....	29
5.4	Esterilización y desinfección.....	30
5.5	Medios de cultivo.....	33
5.5.1	Componentes.....	34
5.5.2	Clasificación.....	34
5.5.3	Preparación.....	36
5.5.4	Control de calidad.....	37
5.5.5	Técnicas de inoculación.....	40
5.5.6	Técnicas de aislamiento.....	43
5.6	Identificación bacteriana.....	45
5.6.1	Métodos fenotípicos.....	46
5.6.1.1	Tinciones.....	47
5.6.1.1.1	Tinción de Gram.....	50
5.6.1.2	Pruebas bioquímicas.....	51
5.6.2	Métodos genotípicos.....	55

5.6.2.1 Marcadores moleculares.	55
5.6.2.2 Métodos proteómicos.	56
5.7 Métodos de conservación microbiana.	57
5.8 Cepario.	58
5.8.1 Control de calidad del cepario.	61
5.8.2 Pruebas de viabilidad y pureza.	62
5.9 Definición de manual.	64
5.9.1 Objetivos de los manuales.	65
5.9.2 Importancia de los manuales.	66
5.9.3 Clasificación de los manuales.	66
5.9.3.1 Manual de procedimientos.	68
5.9.3.1.1 Criterios para su realización.	69
5.10 Manual digital en el software Genially.	69
5.10.1 Importancia de un manual digital.	72
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.	74
6.1. Protocolos.	76
6.2 Activación de cepas.	78
6.3 Pureza: Aislamiento.	78
6.3.1 Reserva.	79
6.3.2 Técnicas rápidas.	80
6.4 Pruebas bioquímicas.	83
6.4.1 Agar Entérico Hektoen.	83
6.4.2 Agar de Eosina y Azul de metileno.	84
6.4.3 Agar MacConkey-Sorbitol.	85
6.4.4 Agar Salmonella y Shigella.	86
6.4.5 Agar Triple azúcar hierro o TSI.	87
6.4.6 Agar Verde Brillante.	89
6.4.7 Medio Base Oxford.	90
6.4.8 Agar Citrato de Simons.	91
6.4.9 Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD).	92
6.4.10 Agar Eschericia coli.	94
6.5 Viabilidad.	96
6.5.1 Conteo de colonias.	97
6.6 Conservación.	97

6.6.1 Establecimiento del cepario	97
VII. VII. RESULTADOS.....	98
7.1 Resultados de las pruebas.....	98
7.2 Contenido del Manual didáctico.	104
7.2.1 Diseño del manual.....	105
7.3 Fichas técnicas de las bacterias del cepario.....	112
VIII. CONCLUSIONES	118
IX. RECOMENDACIONES	119
X. REFERENCIAS	120

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Morfología colonial en medio de cultivo sólido.....	15
Cuadro 2. Clasificación de las bacterias de acuerdo a su forma.	19
Cuadro 3. Estructura interna y externa de las bacterias.	20
Cuadro 4. Clasificación de las bacterias por sus requerimientos nutricionales.	25
Cuadro 5. Diferentes metodologías para realizar la Tinción de Gram.....	50
Cuadro 6. Pruebas bioquímicas.....	52
Cuadro 7. Algunas de las principales colecciones de cultivos bacterianos en el mundo.....	60
Cuadro 8. Viabilidad de los microorganismos.	63
Cuadro 9. Pureza de los microorganismos.....	64
Cuadro 10. Clasificación de los manuales.....	67
Cuadro 11. Clave del cepario bacteriano del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria.	76
Cuadro 12. Cepas bacterianas conservadas en el Laboratorio de Inocuidad Alimentaria.....	77
Cuadro 13. Preparación de colorantes.....	80
Cuadro 14. Resultados de la prueba de catalasa.....	82
Cuadro 15. Resultados Agar Énterico Hektoen.....	84
Cuadro 16. Resultados en Agar Eosina y Azul de Metileno.....	85
Cuadro 17. Resultados en Agar MacConkey con Sorbitol.....	86
Cuadro 18. Resultados en Agar Salmonella y Shigella.....	87
Cuadro 19. Resultados en Agar Triple Azúcar Hierro.....	88
Cuadro 20. Resultado en Agar Verde Brillante.....	90
Cuadro 21. Resultados en Medio Base Oxford.....	91
Cuadro 22. Resultados en Agar Citrato de Simmons.....	92
Cuadro 23. Resultados en Agar Xilosa Lisina Desoxicolato.....	93
Cuadro 24. Resultados en Agar Escherichia coli.....	95
Cuadro 25. Resultados de pruebas rápidas y bioquímicas realizadas a las bacterias que conforman el cepario del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología colonial en tubo con agar inclinado.....	16
Figura 2. Morfología colonial en tubo con medio de cultivo sólido vertical.....	16
Figura 3. Morfología colonial en tubo con medio líquido (caldo).....	17
Figura 4. Fisión binaria.....	27
Figura 5. Curva de crecimiento.....	28
Figura 6. Técnicas de inoculación en caja Petri con medio sólido.....	42
Figura 7. Técnicas de inoculación en tubo con medio de cultivo líquido, sólido y semisólido.....	43
Figura 8. Técnicas de aislamiento.....	44
Figura 9. Componentes de la identificación bacteriana.....	46
Figura 10. Componentes del método fenotípico de la identificación bacteriana.....	47
Figura 11. Pasos realizados en una tinción de microorganismos.....	49
Figura 12. Clasificación de las tinciones.....	49
Figura 13. Componentes del método genotípico de identificación bacteriana.....	55
Figura 14. Componentes del control de calidad a un cepario.....	62
Figura 15. Logo del software Genially.....	72
Figura 16. Contenido de manual didáctico.....	75
Figura 17. Agar Luria Bertani inoculado por la técnica de estría masiva.....	78
Figura 18. Agar Luria Bertani por estría cruzada.....	79
Figura 19. Procedimiento para realizar la Tinción de Gram siguiendo el método de Harvey RA, Champe PC.....	81
Figura 20. Resultados de la Tinción de Gram.....	82
Figura 21. Ordenamiento de tubos para diluciones.....	96
Figura 22. Diluciones seriadas de tubos de peptona de caseína.....	96
Figura 23. Caja Petri de Agar MacConkey inoculado con la técnica de gota en placa.....	97
Figura 24. Portada del manual digital.....	105
Figura 25. Icono de interacciones.....	106
Figura 26. Vista previa del icono de interacciones.....	106
Figura 27. Vista previa de un acercamiento al contenido.....	107
Figura 28. Ejemplo del contenido del manual digital.....	107
Figura 29. Icono de salida.....	108
Figura 30. Icono regresar.....	108
Figura 31. Icono anterior.....	108
Figura 32. Ejemplo del diseño en el apartado de "resultados".....	110
Figura 33. Ejemplo de la ventana "Control de calidad".....	111
Figura 34. Final de la presentación.....	111

RESUMEN

Elaboración de un manual didáctico en línea, para la organización, mantenimiento y preservación del cepario bacteriano del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Ciencias Agrícolas.

Tamara Betzabé García Sánchez. Ingeniera Agrónoma Industrial
Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas.
Directoras: Dra. Ana Tarin Gutierrez Ibañez, Dra. Rosa Laura Ocaña De Jesús
Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Campus Universitario

El Cerrillo, Piedras Blancas Toluca, Estado de México, México. 50200.



rlocanaj@uaemex.mx

atarini@uaemex.mx;

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo elaborar un manual didáctico en línea, para la organización, mantenimiento y preservación del cepario bacteriano del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Ciencias Agrícolas. El cual está diseñado para que los usuarios tengan una guía sobre los procedimientos prácticos que se pueden realizar al cepario bacteriano, abarca conocimientos teóricos sobre generalidades de bacterias (características morfológicas y microscópicas), esterilización, descripción de los diferentes medios de cultivo usados para el aislamiento de dichos microorganismos, información sobre técnicas de tinción y pruebas bioquímicas complementarias. Sirviendo de apoyo para la organización, mantenimiento y preservación del cepario en el mismo sentido de aplicación a la docencia y para futuras investigaciones, siendo entonces un medio útil de enseñanza y aprendizaje con altas implicaciones pedagógicas.

El manual está elaborado con el fin de que dicha información se encuentre en un mismo documento de manera comprensible y accesible para cualquier persona que esté interesado en el trabajo de laboratorio con bacterias, pudiendo facilitar la investigación en microbiología de manera autónoma; permitiendo con ello el desarrollo de procedimientos, destrezas en el manejo del instrumental de laboratorio, habilidades cognitivas e investigadoras y el aprendizaje verbal.

Finalmente, el manual de laboratorio termina siendo una herramienta accesible a toda persona y de carácter informativo útil, que pueda ser incluida dentro de los sistemas de documentación y de gestión del laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMéx.

Palabras clave: cepario, bacteria, manual e inocuidad.

ABSTRACT

Development of an online teaching manual for the organization, maintenance and preservation of the bacterial strain collection of the Food Safety Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences.

Tamara Betzabé García Sánchez. Ingeniera Agrónoma Industrial
Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas.
Directoras: Dra. Ana Tarín Gutiérrez Ibañez, Dra. Rosa Laura Ocaña De Jesús
Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. Campus Universitario

El Cerrillo, Piedras Blancas Toluca, Estado de México, México. 50200.  atarini@uaemex.mx;
rlocanaj@uaemex.mx

The objective of this research work was to develop an online didactic manual for the organization, maintenance and preservation of the strain collection in the Food Safety Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences. It is designed so that users have a guide on the practical procedures that can be carried out in the collection of bacterial strains collection, of covers theoretical knowledge about the generalities of bacteria (morphological and microscopic characteristics), sterilization, descriptions of the different culture media used for the isolation of said microorganisms, information on staining techniques and complementary biochemical tests. Serving as support for the organization, maintenance and preservation of the stock collection in the same sense of application to teaching and future research, it is then a useful means of teaching and learning with high pedagogical implications.

The manual is prepared so that this information is found in the same document in a way that is understandable and accessible to anyone who is interested in laboratory work with bacteria, being able to facilitate research in microbiology autonomously, thereby allowing the development of procedures, skills in handling laboratory instruments, cognitive and investigative skills and verbal learning.

Finally, the laboratory manual ends up being a tool accessible to everyone and of useful informative nature, that can be included within the documentation and management systems of the Food Safety Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the UAEMéx.

Keywords: strain collection, bacteria, manual and harmless.

I. INTRODUCCIÓN.

En la travesía por preservar la diversidad biológica, los ceparios se erigen como pilares esenciales, fuentes de recursos genéticos que trascienden su mero propósito de resguardo. Estas colecciones de microorganismos, como las reconocidas ATCC a nivel internacional y los ceparios nacionales presentes en instituciones educativas, no solo salvaguardan la biodiversidad, sino que también se convierten en catalizadores del progreso en docencia, investigación y aplicaciones comerciales (Gutierrez et al, 2015; UNAM).

En el Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Ciencias Agrícolas, nuestra ambición es crear y mantener un cepario de bacterias con la más alta calidad. Este cepario, integrado con réplicas de cepas comerciales y donaciones de bancos primarios para investigaciones, representa un compromiso con el control de calidad riguroso. Se enfoca en aspectos cruciales como la identidad, pureza y estabilidad genética de las cepas, utilizando métodos detallados como análisis de crecimiento, resistencia a antibióticos y caracterización bioquímica (Pérez et al., 2003).

La conexión entre la investigación y la educación se fortalece con la creación de un manual digital en Genially. Más que una herramienta estática, este manual interactivo desempeña un papel vital al proporcionar acceso global a la educación y facilitar la investigación. La elección de Genially, con su capacidad de actualización continua, refleja la evolución constante de la tecnología en el ámbito educativo (Bono, 2014).

La elección del término "manual," etimológicamente derivado de "*manuale manualis*" en latín (libro portátil, que puede llevarse en la mano), destaca la portabilidad y accesibilidad que caracterizan a los manuales digitales. La integración de esta herramienta digital en el entorno del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria busca fomentar la autonomía en los procedimientos de laboratorio y promover un aprendizaje holístico que abarque desde conductas científicas hasta habilidades investigadoras y cognitivas.

En resumen, desde la preservación de la diversidad biológica hasta el diseño de un manual digital, nuestra visión en el Laboratorio de Inocuidad Alimentaria se centra en una sinergia entre la conservación, la calidad en investigación y el impulso educativo, todo ello respaldado por herramientas modernas y accesibles.

II. OBJETIVOS.

2.1 Objetivo General.

Elaborar un manual didáctico en línea para la organización, mantenimiento y preservación del cepario bacteriano, del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria, de la Facultad de Ciencias Agrícolas.

2.2 Objetivo Específico.

- Establecer los procedimientos en la caracterización fenotípica y bioquímica de las bacterias de la colección del cepario del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria.
- Diseñar un manual en línea con el software Genially que integren los procedimientos de identificación bacteriana del cepario del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria.
- Crear las fichas técnicas de las cepas bacterianas que integran el cepario.

III. HIPÓTESIS.

El manual propuesto es una herramienta educativa útil en la identificación correcta de las bacterias que componen el cepario, el cual apoyará a la investigación, servicio y difusión. Además de contribuir en la formación académica práctica y teórica del docente.

IV. JUSTIFICACIÓN.

El laboratorio de Inocuidad Alimentaria no cuenta con una herramienta que ayude a los procedimientos de identificación bacteriana en este sentido es necesario contar con un manual didáctico que establezca los procedimientos en la caracterización fenotípica y bioquímica de las bacterias que integran el cepario de dicho laboratorio.

Este manual permitirá llevar a cabo trabajos de laboratorio de una manera autónoma y rápida; a su vez podrían desarrollar habilidades cognitivas de investigación debido a la implementación de trabajos prácticos. Desde la experiencia personal de la autora, se considera que al no haber un manual didáctico para la organización, mantenimiento y preservación del cepario del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria, las investigaciones por parte de los estudiantes se pueden dificultar, puesto que la información que buscan al respecto está distribuida y en algunos casos es compleja de entender, es decir no es lo suficientemente clara, lo cual podría conllevar a que su interés en el trabajo autónomo con microorganismos disminuya, perdiéndose la oportunidad de desarrollar y/o potencializar habilidades que nacen a partir de los trabajos prácticos. Además, el trabajo con microorganismos permite abordar muchos conceptos trabajados en microbiología, pero si se recurre a la teoría, se limitan los métodos de investigación o experimentación evidente para los estudiantes trayendo como consecuencia, una enseñanza basada en referentes teóricos que podrían ser de poco interés para los estudiantes, puesto que no favorece en gran medida el poder relacionar lo aprendido desde la teoría como un proceso real de su ambiente inmediato.

El diseñar un manual en línea con el software Genially permitirá que los procedimientos de identificación bacteriana del cepario del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria sean más didácticos y de mayor comprensión. Así mismo, la creación de las fichas técnicas de las cepas bacterianas permitirá una identificación con mayor exactitud de manera inmediata.

V. REVISIÓN DE LITERATURA.

5.1 Origen y evolución de los microorganismos.

La Tierra tiene unos 4,600 millones de años, y hay pruebas que muestran que las células microbianas aparecieron por primera vez hace 3,800 y 3,900 millones de años, las cianobacterias empezaron a oxigenar la tierra hasta hace 3,000 millones de años y sin embargo la microbiología es una ciencia joven de apenas 150 años (Madigan *et al.*, 2015). La microbiología (de *microbio* y el gr. *Logos*, tratado) (Real Academia Española, n.d.) ciencia que trata de los seres minúsculos, invisibles a simple vista, que se denominan microbios o microorganismos, se dedica al estudio de las regularidades que rigen la vida y el desarrollo de estos, así como las alteraciones que provocan en el organismo humano, animal, vegetal o en la naturaleza inanimada (Aponte, 2013). Su objeto de estudio son los microorganismos y cómo funcionan, especialmente las bacterias (grupo muy grande de células muy pequeñas), es decir, que estudia la diversidad y evolución de las células microbianas, para saber cómo y por qué surgieron los diferentes tipos de vida en el planeta tierra con el objetivo de comprender cómo es que funciona el mundo microbiano y sacarles provecho a estos conocimientos usándolos en beneficio de la humanidad y del planeta tierra, los microbiólogos son las personas que estudian las bacterias que habitan en ambientes extremos, para descubrir los límites ambientales de la vida y encontrar productos exclusivos de esas bacterias que puedan resultar beneficiosos para los seres humanos y para nuestro planeta (Murray *et al.*, 2012).

5.2 Bacteria.

Por lo general, las células son muy pequeñas para observarlas a simple vista. Fue gracias a la invención del **microscopio** en el siglo XVII que se les pudo observar. A partir de este momento y durante cientos de años, todo lo que se supo sobre las células se descubrió con este instrumento

(Aleyda *et al.*, 2012). La invención del microscopio, a diferencia de muchos otros instrumentos en la historia de la ciencia, resultó en la creación de una nueva ciencia: la microbiología. El desarrollo técnico de este instrumento logró revelar mundos cada vez más complejos para el entendimiento humano (Gómez, 2004). Si se tuviera que nombrar a la primera persona que hizo un hallazgo en la búsqueda de la célula, esta persona debería ser el arquitecto Robert Hooke (1635-1703), con el ánimo de satisfacer su curiosidad por lo desconocido, construyó su propio microscopio, con el que aumentó la muestra unas 150 veces, lo que le permitió conocer y describir detalles de objetos y organismos. Entre estos objetos, un trozo de corcho, en el cual observó unos huecos, que comparó con un panel de abejas, llamándolo “célula” (Carrillo *et al.*, 2011).

El término **procariota** significa “antes del núcleo”. Las células procariontes constan de una organización interna bastante sencilla, comparada con la organización de las células eucariontes. Las características distintivas primarias de las células son su tamaño relativamente pequeño, habitualmente del orden 0.2 – 10.0 μm y ausencia de una membrana nuclear. El ADN de casi todas las bacterias es circular, este es el cromosoma de la célula procariota, el tamaño pequeño del cromosoma en las células procariotas limita la cantidad de información genética que puede contener, el número de genes que puede tener una célula procariota es de 3000 y muchos deben estar dedicados a funciones esenciales, como generación de energía, síntesis de macromoléculas y división celular. Una célula procariota cualquiera contiene relativamente pocos genes que permiten la adaptación fisiológica del microorganismo al ambiente por lo que cada grupo de procariota abarca un nicho ecológico muy restringido. Las procariotas se dividen en dos grupos principales (arqueobacterias y bacterias), la mayor parte de las investigaciones se han orientado sólo a uno de ellos, las bacterias ya que estudiar al grupo arqueobacteria resulta ser más complicado de estudiar en laboratorio, pero se sabe que tienen una conexión directa con las células eucariotas, ya que el núcleo eucariota puede provenir de un ancestro arqueobacteriano (Brooks *et al.*, 2015).

Una **bacteria** es un organismo unicelular muy simple, procarionte con pared celular de peptidoglicano, primeros seres vivos de la tierra pueden estar presentes en todo el planeta y algunos son causantes de enfermedades para los humanos (Robles & Ayala, 2016). La descripción general del dominio Bacteria sería una estructura celular es propia de una célula procariota, cuenta con un cromosoma circular y desnudo, la pared celular se compone de peptidoglicano, el enlace lipídico de la membrana es mediante un enlace éster, la conformación de los ácidos grasos de la membrana es lineal, cuentan con flagelos de tipo bacteriano, ribosomas de 70S, tiene plásmidos, el iniciador de ARN de transferencia (ARNt) es el formil-metionina, sus factores de elongación son -TS, -G y -P, tiene una ARN polimerasa y de 4 a 5 subunidades de la misma, las bacterias son sensibles a la estreptomycin y cloranfenicol (antibióticos) además son resistentes a la toxina diftérica (bacteria que causa la difteria) (Curtis *et al.*, 2011).

5.2.1 Clasificación y nomenclatura

El asignar nombres a las bacterias se basa en la taxonomía, que es la ciencia de clasificación biológica que agrupa organismos según sus afinidades o similitudes. En ella se incluye tanto la identificación como la nomenclatura. Los elementos básicos de los caracteres taxonómicos son diversos: morfología, fisiología, bioquímica, ecología, biología molecular y genética. Con todos ellos se compila una serie de datos que llevan a la caracterización, clasificación y nomenclatura. Dos son los principales esquemas de clasificación: uno basado en las características observables de un organismo dado (fenotípica), y la que tiene en cuenta las relaciones de evolución ancestral de los seres vivos, en nuestro caso las bacterias (filogenética) (Gobernado & López, 2003). Una especie bacteriana, es como un grupo de individuos con ciertas características dominantes en común, pero que varían más o menos dentro de un promedio; los grupos y tipos interespecies, se basan en las diferencias antigénicas ya que la estructura química ligeramente diferente de los polisacáridos en la capsula hace que cada tipo forme un anticuerpo específico. En consecuencia, se dice que

determinados carbohidratos capsulares son de “tipo específico”. Puesto que la división en tipos depende de reacciones específicas con el suero de animales inmunizados, es correcto hablar de variedades según tipos serológicos; Una cepa bacteriana es una población de microorganismos que desciende de un único microorganismo contiene pureza genética (Cepa Tipo), cada cultivo puro que tenga una procedencia o un tiempo de origen diferente constituye una cepa separada. Para describir una especie bacteriana, el bacteriólogo debe estudiar una colección de cepas aisladas, de distintas procedencias, en distintas condiciones, señalando lo más representativo en sus distintas fases de crecimiento (lisa, rugosa y mucóide); los serotipos representan propiedades antigénicas diferentes; los biovars son variantes de cepas bacterianas por diferencias bioquímicas y fisiológicas. Actualmente se ha establecido el sistema binario para las bacterias, de acuerdo con este sistema, cada organismo tiene un nombre formado de dos partes: el *género*, con su primera letra mayúscula, seguido del nombre de la *especie*, con minúsculas. El nombre va en latín y se escribe con letras cursivas, sin embargo, estas dos palabras no satisfacen plenamente todas las necesidades. Los bacteriólogos se han visto obligados a añadir términos adicionales para designar variedades o *tipos* dentro de muchas especies.

Reglas para la nomenclatura bacteriana: La base de la clasificación actual es un informe emitido por un comité de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos publicado en 1920, que incluía la información y las mejores opiniones de la época. Este esquema ha sido modificado por Bergey y colaboradores, en sucesivas ediciones del *Manual of Determinative Bacteriology*. El interés por la denominación bacteriana llevó a la formación de un “Comité Internacional de Nomenclatura Bacteriológica” y una “Comisión Jurídica Asociada”. En 1947 esta comisión dictó un código bacteriológico internacional de nomenclatura que no ha cesado de ampliarse desde entonces. Los nombres de los taxones con la categoría de *órdenes* terminan en *-ales* y los de las *familias*, con la terminación en *-aceae*; algunas

bacterias pueden tener hasta diez ordenes, junto con géneros y especies representativas. Los nombres que son más utilizados se encuentran en el manual de Bergey.

5.2.1.1 Manual de Bergey

La clasificación propuesta por esta primera edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology está basada en la tinción de Gram. Así, para fines prácticos las bacterias pueden dividirse en cuatro subgrupos fenotípicos:

- **Bacterias Gram negativas que tienen pared celular:** Estas tienen un perfil de pared celular de tipo gramnegativo que consiste en una membrana externa y una capa interna de peptidoglicano relativamente delgada. Así como un complemento variable de otros componentes fuera o entre estas capas. Las formas de las células pueden ser esferas, óvalos, varillas rectas o curvas, hélices, o filamentos; algunas de estas formas pueden estar envainadas o encapsuladas. La reproducción se realiza por fisión binaria, pero algunos grupos muestran gemación y un grupo raro muestra fisión múltiple. Este grupo pertenecen los Gracilicutes que incluyen a *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pneumoniae*, *Neisseria*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Borrelia*, *Treponema pallidum*.
- **Bacterias Gram positivas que tienen pared celular.** Las bacterias tienen un perfil de pared celular de tipo Gram positivo; No hay membrana externa y la capa de peptidoglicano es relativamente grueso. Algunos miembros del grupo tienen ácidos teicoicos y/o polisacáridos neutros como componentes de la pared. Las células pueden ser esferas, bastones, o filamentos; las varillas y los filamentos pueden no estar ramificados, pero muchos muestran verdaderas ramificaciones. La reproducción celular generalmente se realiza por fisión binaria; algunos producen esporas en forma de reposo (endosporas o esporas en hifas). Los miembros de esta división incluyen bacterias asporógenas y esporógenas simples, así como los actinomicetos y sus parientes. Las bacterias Gram positivas son generalmente

heterótrofas quimiosintéticas e incluyen especies aeróbicas, anaeróbicas, anaeróbicas facultativas y microaerófilas. Este grupo pertenecen los Firmicutes que incluyen a *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium diphtheriae*.

- **Bacterias que carecen de pared celular.** Estas bacterias se denominan comúnmente micoplasmas. No sintetizan los precursores del peptidoglicano y son insensibles a los antibióticos blactámicos u otros antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular. Ellos están rodeados por una membrana unitaria, la membrana plasmática. Las celdas son altamente pleomórficas y varían en tamaño desde grandes deformables vesículas hasta elementos filtrables muy pequeños (0,2 μm). Las formas filamentosas con proyecciones ramificadas son comunes. Reproducción puede ser por gemación, fragmentación y/o fisión binaria. Los grupos muestran un grado de regularidad de forma debido a la colocación de estructuras internas. Por lo general, no son móviles, pero algunas especies muestran una forma de motilidad deslizante. No se conocen formas en reposo. Este grupo pertenecen los Tenericutes que incluyen a la micoplasma.
- **Bacterias filogenéticamente anteriores a las divisiones mencionadas** como los Mendosicutes son procariontes filogenéticamente anteriores a las divisiones mencionadas, no tienen mureína en las paredes celulares y también se conocen como arqueas. Estos pueden teñir tanto gram positivos como negativos, ya que las arqueas tienen mucha variedad. Pared celular defectuosa con composición inusual de la pared celular (Bergey, 1989).















5.2.2 Morfología colonial

Cuando las bacterias crecen en la superficie de un medio nutritivo solidificado con agar o gelatina, las células que proliferan quedan prácticamente en posición fija y forman masas de millones y millones de células observables a simple vista. Las colonias así formadas tienen dimensiones desde las mínimas, apenas visibles hasta masas de varios milímetros de diámetro, las cuales presentan características no solo de volumen sino también de forma y textura, y en algunos casos de color que, si bien hasta cierto punto depende de la naturaleza del medio de cultivo y de las condiciones de incubación, en circunstancias establecidas son constantes y muchas veces de gran valor diferencial. Una **colonia** de bacterias se define como el conjunto de bacterias de la misma especie que se acumulan de forma característica cuando encuentran recursos favorables para su reproducción. Pueden distinguirse las especies (entre otras características); por la forma, tamaño, color de estas colonias (Robles & Ayala, 2016).

Características de cultivo en **caja Petri**, cuando tienes un cultivo en agar es relevante anotar la morfología colonial (colonias aisladas) de la cepa bacteriana para facilitar, la identificación. Generalmente se reporta la morfología colonial tal como uno la percibe, por ejemplo, si se ves que las colonias bacterianas son como puntitos, pues reportan que son puntiformes, si son lisas pues reportan que son lisas, si observas que están como moco, se reportan que están mucosas, también características que se consideran importante para identificarlas son por ejemplo el olor y color.

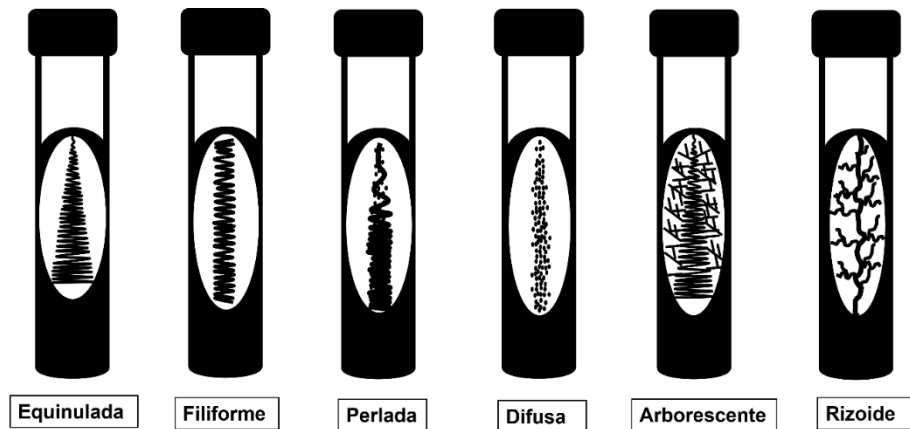
En el cuadro 1 muestra la morfología colonial de las diferentes formas de crecimiento de las bacterias en un medio de cultivo sólido.

Cuadro 1. Morfología colonial en medio de cultivo sólido.

Forma	Borde	Elevación	Superficie.
 Puntiforme.	 Filamentosa.	 Plana.	<ul style="list-style-type: none"> • Lisa. • Rugosa. • Mate. • Brillante. • Seca. • Cremosa. • Invasiva.
 Circular.	 Entero.	 Elevada.	
 Rizoide.	 Ondulada.	 Convexa.	
 Irregular.	 Lobulada.	 Crateriforme.	
 Filamentosa.		 Acuminada.	

(Modificado de Burrows, 1983)

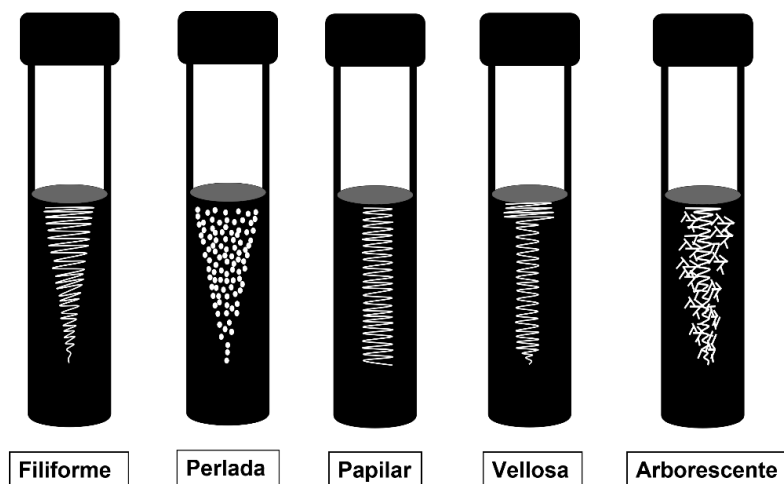
Características de cultivo en **tubo con agar inclinado**, la cantidad puede ser escasa, abundante o moderado, el borde o margen de desarrollo puede ser uniforme o presentando diferentes irregularidades, similares a las que se presentan en la caja, así como la consistencia que se puede ser seca, que puede moverse sobre el agar con el asa, una consistencia viscosa que se pega al asa y que forma filamentos mucosos al despegarlo del agar, por ejemplo. La coloración es similar a la que se presenta en la caja, la forma de crecimiento en la estría del agar: el crecimiento en la estría se puede clasificar como: filiforme, equinada, perlada, difusa, arborescente y rizoide, así como la forma de crecimiento en la línea de picadura: filiforme, perlada, papilar, vellosa y arborescente. La figura 1 muestra la morfología colonial en base a su forma de crecimiento de las bacterias sembradas en tubo inclinado con agar.



(Modificado de Burrows, 1983)

Figura 1. Morfología colonial en tubo con agar inclinado.

Características de cultivo en **tubo con agar vertical**: La cantidad de desarrollo puede ser escaso, moderado, abundante. La distribución del desarrollo se observa en la turbidez, opacidad más o menos densa, que es signo de crecimiento. Así como el sedimento que se observa si hay depósito de células en el fondo del tubo, figura 2.

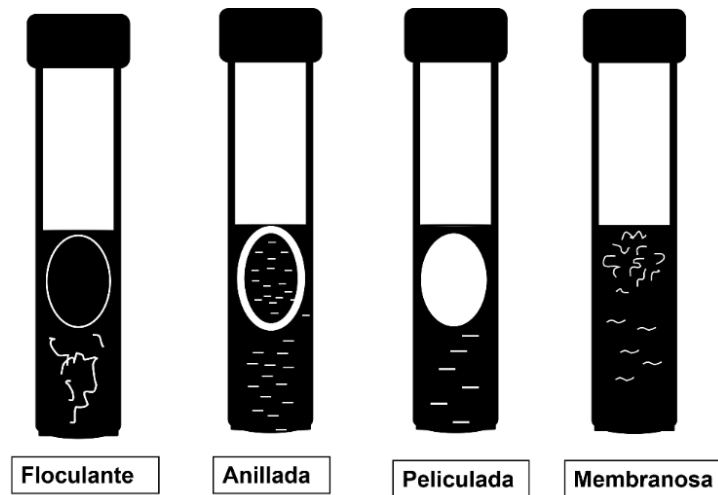


(Modificado de Burrows, 1983)

Figura 2. Morfología colonial en tubo con medio de cultivo sólido vertical.

Características de cultivo en la superficie del **caldo**: Se observará si hay un crecimiento en la superficie clasificándolo de la siguiente manera: floculenta, anillada, peliculada y membranosa.

Figura3.



(Modificado de Koneman, 2008)

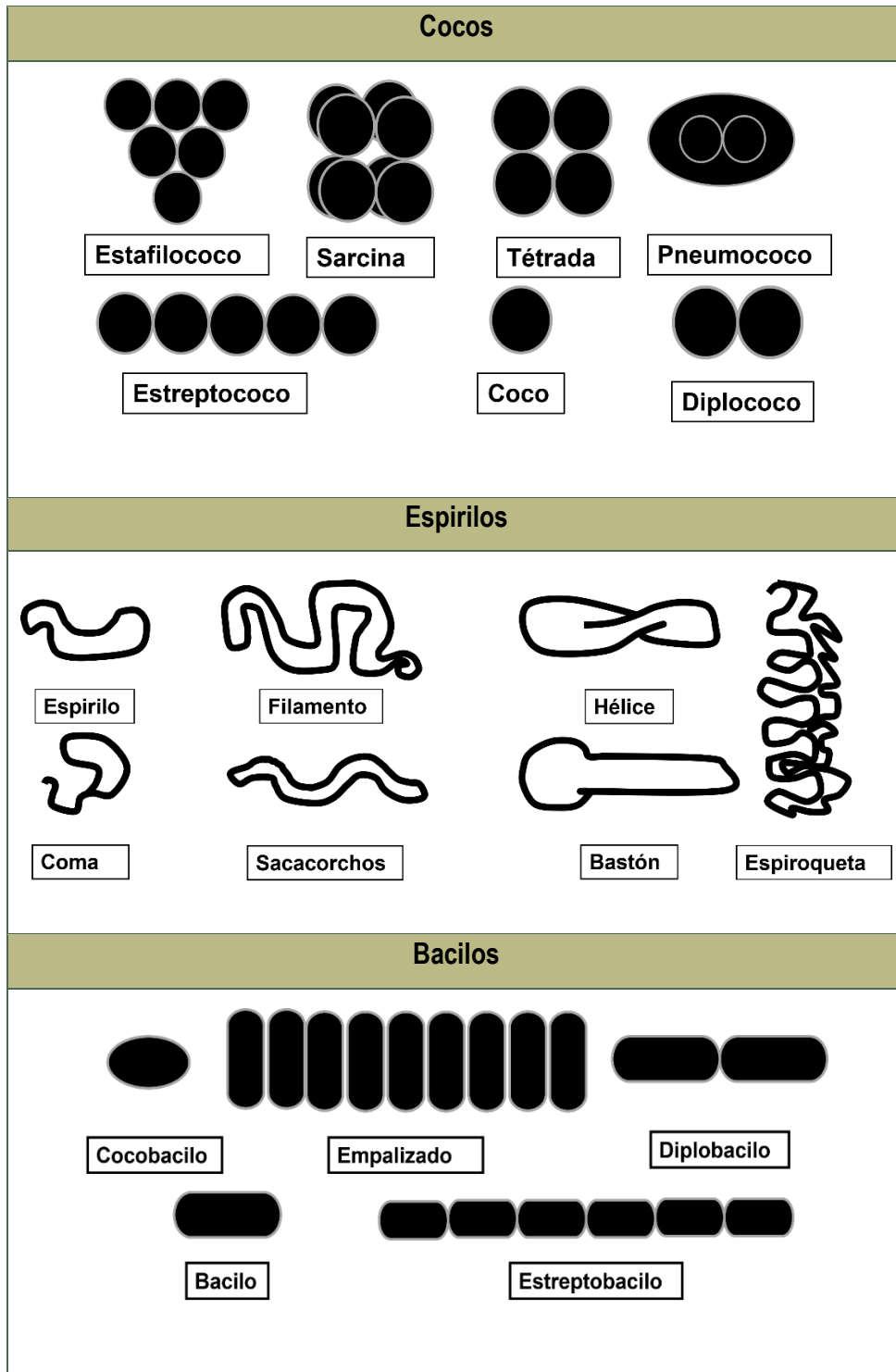
Figura 3. Morfología colonial en tubo con medio líquido (caldo).

5.2.3 Morfología bacteriana.

La **forma** de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en *cocos*: son esféricas u ovaladas, su tamaño oscila entre los 0.8 a 1 μ m, a su vez se agrupan en diplococos (permanecen en pares), tétradas (se dividen en dos direcciones perpendiculares, formando una agrupación de cocos en una disposición cuadrada), sarcinas (producto de la división de los cocos en tres direcciones perpendiculares, formando una agrupación de cocos con una disposición cúbica), estreptococos (cadena), estafilococos (formados por la agrupación irregular de cuatro o más cocos, en ocasiones se asemejan a racimos de uvas); *espirilos* en su forma presentan una o más curvaturas, algunas pueden presentar forma de hélices. Dentro de este grupo se encuentran agrupaciones como los Vibriones (espirilos bastante cortos), espirilos (estas bacterias, relativamente rígidas, presentan una forma

helicoidal; se mueven a través de flagelos externos dando una o más vueltas alrededor de su propio eje), espiroquetas (presentan una forma helicoidal, pero a diferencia de los espirilos, poseen un cuerpo flexible, se mueven con la ayuda de filamentos axiales que son flagelos periplasmáticos, lo que les permite dar varias vueltas completas alrededor de su propio eje). Y *bacilos* tienen forma cilíndrica o de bastones ya sean rectos o curvos. Se agrupan a su vez en cocabacilos (forma de bastón, largos y delgados, pequeños y gruesos, también pueden presentar variaciones en sus extremos pudiendo ser rectos, afilados o redondeados), diplobacilos (permanecen en pares), estreptobacilos (cadena de cuatro o más bacilos), empalizado (bacilos agrupados lado a lado), filamentosas (crecen en forma de fibras y toman distintas disposiciones por lo que esta formación se denomina también letras chinas). El cuadro 2 representa las diferentes formas de las bacterias, clasificadas en tres grandes grupos cocos, bacilos y espirilos, a su vez estos tienen subcategorías (Vargas & Vargas, 2014).

Cuadro 2. Clasificación de las bacterias de acuerdo a su forma.



(Elaboración propia)

5.2.4 Fisiología bacteriana

Los elementos básicos para la caracterización fenotípica de un microorganismo es identificar los elementos morfológicos como el tamaño, aspecto, inclusiones, esporas, capsulas, flagelos, tipo de tinción, aspecto en los medios de cultivo como tipo de márgenes, elevación, superficie, textura, opacidad, pigmentación, las propiedades fisiológicas como el margen de crecimiento a distintas temperaturas, pH, atmosfera de O₂ libre, necesidades nutricionales. La observación directa al microscopio de las muestras nos permite evaluar la calidad de la muestra y es útil en la observación de la presencia de bacterias, disposición y su movilidad, así como la existencia de estructuras, otros parásitos y células (Madigan *et al.*, 2015). El cuadro 3 nos muestra que todas las células contienen partes en común, sin embargo, las células procariotas, suelen ser más pequeñas y de estructura sencilla, los elementos bacterianos se dividen en elementos internos (membrana citoplasmática, citoplasma, cromosoma bacteriano, ribosoma bacteriano, inclusiones citoplasmáticas y plásmidos) y elementos externos (pared celular, capsula, flagelos, fimbrias y pilis). Por otro lado, los elementos obligados están presentes en todas las células procariotas y son esenciales para la bacteria (pared celular, membrana citoplasmática, citoplasma, cromosoma bacteriano y ribosoma bacteriano) los elementos facultativos no se encuentran en todas las bacterias y no son indispensables para la supervivencia de la célula (capsula, flagelos, fimbrias, inclusiones citoplasmáticas, pilis, plásmidos)

Cuadro 3. Estructura interna y externa de las bacterias.

Externa	Interna
<ul style="list-style-type: none">• Pared celular• Capsula• Flagelos• Fimbria• Pilis	<ul style="list-style-type: none">• Membrana citoplasmática• Citoplasma• Cromosoma bacteriano• Ribosoma bacteriano• Inclusiones citoplasmáticas• Plásmidos

(Elaboración propia)

5.2.4.1 Estructura externa.

Cápsula, algunas bacterias (grampositivas o gramnegativas) se encuentran rodeadas por capas laxas de proteínas, que apenas es visible al microscopio por lo que debe visualizarse por la exclusión de partículas de tinta china. En los casos en que la adhesión es muy débil y el grosor o la densidad no son uniformes, se habla de capa de limo (slime layer). Las cápsulas y la capa de limo se conocen también como glucocálix. Aunque las cápsulas y las capas de limo son innecesarias para el crecimiento de las bacterias, revisten una gran importancia para su supervivencia en el organismo anfitrión. La cápsula es poco antigénica y antifagocítica; además, constituye un factor de virulencia significativo. La cápsula puede actuar también como barrera frente a moléculas hidrófobas tóxicas (p. ej., detergentes) así como facilitar la adherencia a otras bacterias o a las superficies de los tejidos del anfitrión. Durante el cultivo in vitro pueden aparecer cepas bacterianas que carecen de una cápsula en ausencia de la presión del organismo anfitrión y son, por tanto, menos virulentas (Murray *et al.*, 2021).

Pared celular, es una envoltura externa formada por peptidoglucano que confiere forma y rigidez a la bacteria. Tiene una afinidad antimicrobiana, en las bacterias gramnegativas resulta ser más gruesa que las bacterias grampositivas pues estas poseen una membrana celular externa, que rodea la capa de peptidoglucano. Esa membrana es una bicapa lipídica que contiene lipolisacáridos, y desempeña un importante papel de barrera frente a determinados antimicrobianos. En la misma existen un gran número de proteínas, que representan en torno al 40% de su peso total, entre las cuales se encuentran las porinas, proteínas triméricas o monoméricas que forman conductos o poros hidrófilos que permiten el acceso al peptidoglucano. A través de estos poros difunden de forma pasiva pequeñas moléculas hidrofílicas (menores de 600Da), pero se impide el paso de otras mayores. La pared celular puede verse afectada en la síntesis o el transporte de sus precursores o en su organización estructural por ejemplo desde el punto de vista molecular, los antimicrobianos de uso

clínico ejercen su acción en algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas: inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos (Calvo & Martínez, 2009).

Fimbrias, son estructuras adherentes, la adherencia de un microorganismo a una superficie es el paso inicial en la formación de la mayoría de bicapas (comunidad de microorganismos adheridos a una superficie) esta cualidad tiene un papel importante en la supervivencia de las bacterias ya que les asegura colonizar al huésped, esta cualidad se determina por la combinación de interacciones entre la superficie bacteriana, la superficie del sustrato y el medio ambiente que los rodea, las estructuras bacterianas que median este proceso de adherencia reciben el nombre de adhesinas (proteína) a través de ella la bacteria contacta con la superficie de la célula huésped. La unión entre la adhesina y su receptor en la célula huésped suele ser bastante específica. Hasta la actualidad se han definido tres tipos principales de interacción adhesina-receptor (Lectina-hidrato de carbono, Proteína-proteína, Hidrofobia-proteína) (Vila *et al.*, 2008).

Pilis, son unidades piliformes formadas por subunidades proteicas (pilina) cumple la función de unir a la bacteria a las células del huésped, (Soriano, 2009). **Pili sexual**, realiza el proceso de la conjugación. La conjugación es un importante mecanismo de intercambio genético entre bacterias. Se trata de una especie de intercambio sexual, puesto que requiere que la cepa dadora (F+) se una a la cepa receptora (F-) (Torrades, 2001).

Flagelo, sirven como propulsores en forma de cuerda, están formados por subunidades proteicas enrolladas helicoidalmente (flagelina); asimismo, se unen a las membranas de las bacterias mediante unas estructuras (gancho y cuerpo basal) y se impulsan por el potencial de membrana. Las especies bacterianas pueden tener uno o varios flagelos en su superficie, los cuales pueden anclarse en diferentes partes de la célula. Los flagelos proporcionan motilidad a las bacterias y permiten que la

célula se dirija hacia los nutrientes y evite las sustancias tóxicas (quimiotaxis). Las bacterias se acercan a sus nutrientes nadando en línea recta para girar luego bruscamente y continuar en una nueva dirección. Este período de desplazamiento aumenta a medida que se incrementa la concentración de la sustancia quimioatrayente. La dirección del giro flagelar determina si las bacterias continúan nadando o bien giran. Los flagelos portan también factores antigénicos y determinantes de la cepa bacteriana (Murray *et al.*, 2021).

5.2.4.2 Estructura interna.

La línea divisora entre estructuras externas y estructuras internas de la célula bacteriana no es neta, quizá en su mayor parte solo está justificada por un concepto utilitario. La **membrana plasmática**, está formada por una bicapa fosfolipídica. Los fosfolípidos forman espontáneamente bicapas estables, con sus grupos polares de cabeza expuestos al agua y sus colas hidrófobas enterradas en el interior de la membrana, es la estructura que delimita a la célula. Inicialmente conceptualizada como una barrera inerte, divisoria del interior y exterior celular, en la actualidad se le reconoce como un elemento dinámico y fundamental en el mantenimiento de la integridad de la célula. Su plétora de componentes lipídicos y proteicos propicia su participación en muy diversos e importantes procesos, por ejemplo: transporte y permeabilidad selectiva de sustancias e iones, excitabilidad, movilidad, diferenciación, exocitosis, reconocimiento intercelular y transducción de señales extracelulares (Meza *et al.*, 2010).

Ribosoma, son orgánulos complejos, altamente especializados, que utilizan los organismos para el complicado proceso de síntesis de proteínas. El ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg), y puede disociarse en dos subunidades, la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S). Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr específicas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas diferentes (numeradas desde S1-S21, donde S

procede de small), mientras que la subunidad 50S contiene los ARNr 5S y 23S junto con unas 34 proteínas (L1-L34; L, large) (Rodicio & Mendoza, 2004).

Plásmidos, son fragmentos circulares de ADN bicatenario de longitud variable que contienen genes de resistencia y poseen la capacidad de replicarse en forma independiente del sistema de duplicación del material genético de la bacteria. Una bacteria puede tener varios plásmidos, y un plásmido individual puede transportar múltiples genes de resistencia. En algunos casos, un solo plásmido puede conferir resistencia a varias familias de antibióticos, lo que facilita que la bacteria desarrolle resistencia a múltiples antibióticos en una sola etapa, volviéndose multirresistente (Oromí, 2000). Las células procariotas se destacan por su capacidad de intercambiar información genética, siendo los plásmidos una herramienta clave en este proceso. Estos pequeños fragmentos de ADN pueden transferirse entre células, llevando consigo información genética especializada a toda una población. Algunos plásmidos, especialmente los de resistencia a fármacos, tienen la capacidad de convertir diversas bacterias en resistentes a los antibióticos. Esta característica hace que los plásmidos sean útiles en ingeniería genética, ya que pueden transferirse de una cepa bacteriana a otra mediante un proceso conocido como "conjugación bacteriana" (Brooks *et al.*, 2015). La ingeniería genética se ha utilizado también para aislar y expresar distintos genes con el propósito de obtener proteínas útiles en bacterias, levaduras o, incluso, en células de insecto (p. ej., insulina, interferón, hormonas del crecimiento e interleucina). Igualmente se pueden preparar grandes cantidades de un inmunógeno puro destinado a una vacuna sin necesidad de emplear los microorganismos patógenos intactos (Murray *et al.*, 2021).

Citoplasma, es una solución de sales, azúcares, aminoácidos, nucleótidos y muchas otras sustancias. La porción hidrófoba de la membrana citoplasmática es una barrera hermética a la difusión de estas sustancias. Si bien algunas pequeñas moléculas hidrófobas atraviesan la membrana por

difusión, las moléculas polares y cargadas no se difunden, sino que deben ser transportadas (Madigan *et al.*, 2015).

Inclusiones citoplasmáticas, se encuentran en el citoplasma son gránulos de diversas sustancias. Algunos son nutrientes que pueden ser desdoblados cuando son necesarios (Aleyda *et al.*, 2012).

Cromosoma, el material genético está constituido mayoritariamente por una molécula de ADN circular (entre 0,5 y 10 millones de pares de bases) y desnudo (Orellana, 2002).

5.2.5 Requerimientos nutricionales

La nutrición es un conjunto de procesos y reacciones mediante las cuales los seres vivos toman del medio, en el que habitan, las sustancias químicas que necesitan para crecer, multiplicarse y hacer uso de la energía (nutrición). Las sustancias mencionadas anteriormente, se denominan nutrientes y son utilizadas con dos fines: energéticos cuando se requieren para el mantenimiento y biosintéticos cuando se demandan para la síntesis de componentes (catabolismo). Para crecer, las bacterias necesitan un mínimo de nutrientes: agua, fuente de carbono, fuente de nitrógeno y algunas sales minerales (anabolismo) (Caycedo *et al.*, 2021). El cuadro 4 nos muestra la clasificación de las bacterias atendiendo a los nutrientes que necesitan para su correcto funcionamiento.

Cuadro 4. Clasificación de las bacterias por sus requerimientos nutricionales.

Fuentes de carbono	
Autótrofos.	Utilizan el dióxido de carbono a partir de él sintetizan todas sus estructuras de carbono que necesitan.
Heterótrofos.	Necesitan una fuente de compuestos orgánicos.
Fuentes de energía	
Fotótrofos.	Utilizan la luz solar.
Quimiótrofos.	Utilizan la energía química proveniente de las reacciones de oxidación-reducción de compuestos orgánicos o inorgánicos.
Fuentes de carbono+Fuentes de energía	
Fotoautótrofos.	Luz solar + dióxido de carbono.

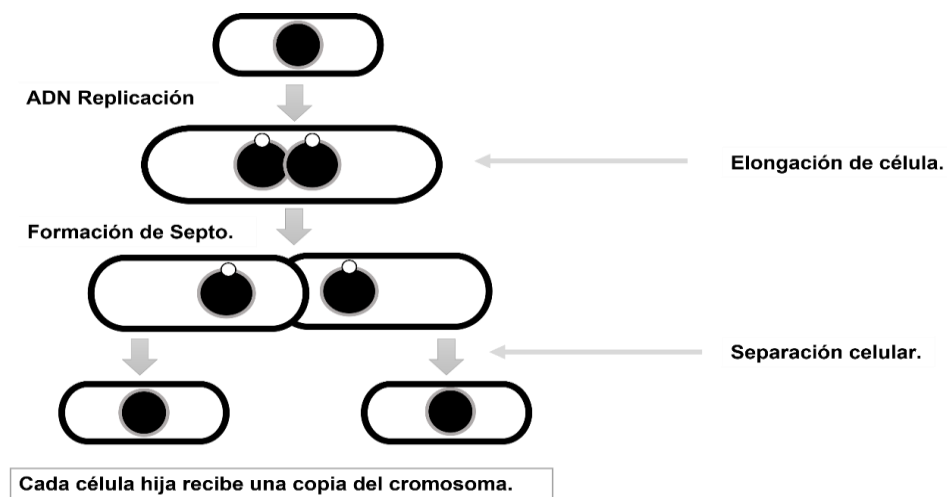
Fotoheterótrofos.	Luz solar + compuestos orgánicos.
Quimioautótrofos.	Dióxido de carbono + compuestos inorgánicos.
Quimioheterótrofos.	Compuestos orgánicos.
Necesidades de Energía	
Aerobias estrictas.	Requieren del oxígeno para llevar a cabo su metabolismo.
Aerobias facultativas.	Crecen en presencia o ausencia de oxígeno.
Microaerófilos.	Necesitan oxígeno, pero a concentración menor que la atmosférica.
Anaerobias estrictas.	Crecen en ausencia de oxígeno.
Anaerobias aerotolerantes.	Pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno, pero la energía la obtienen por fermentación.
Microaerófilas.	Se desarrollan con bajas tensiones de oxígeno (3-5%).
Capnofílicas.	Requieren de al menos 5-10% de dióxido de carbono para crecer.
Temperatura	
Termófilas.	Crecen en rangos de 42-69 °C. Óptima de 60 °C.
Hipertermófilo.	Crecen en rangos de 66-114 °C. Óptima de 80 °C.
Mesófilas.	Crecen en rangos de 9-47 °C. Óptima de 20-40 °C.
Psicrófilas.	Crecen en rangos de 0-20 °C. Óptima de 4 °C.
pH	
Acidófilas.	Rango de 1-5.
Basófilos.	Rango de 8-10.
Neutrófilas.	Rango de 6-7.
Osmofílicas.	Altas concentraciones de Cloruro de Sodio.
Tinción de Gram	
Gram positivas.	Resultan en una coloración azul o violeta.
Gram negativas.	Resultan en una coloración roja o rosa.

(Elaboración propia)

5.2.6 Reproducción bacteriana

A medida que crecen las bacterias, estos microorganismos unicelulares incrementan su tamaño, su peso y la cantidad de material celular proporcionalmente (Chiappa *et al.*, 2009). Las bacterias se reproducen por **fisión binaria**, eso significa que en el momento de reproducirse cada célula bacteriana replica su DNA y a continuación se divide en dos células idénticas entre sí y respecto a la

célula progenitora. Se trata, pues, de un tipo de reproducción asexual para formar dos nuevas células (Velasco, 2015). La figura 4 nos muestra el proceso de la fisión binaria, primero ocurre la elongación de la célula para luego formar el tabique o septo y es el resultado de crecimiento hacia adentro de la membrana citoplasmática y la pared celular desde posiciones opuestas; la formación del septo continua hasta que las dos células hijas se separan y cada célula hija recibe un cromosoma y suficiente copias de ribosomas y todos los demás complejos macromoleculares, monómeros e iones inorgánicos para poder existir como célula independiente (Madigan *et al.*, 2015).



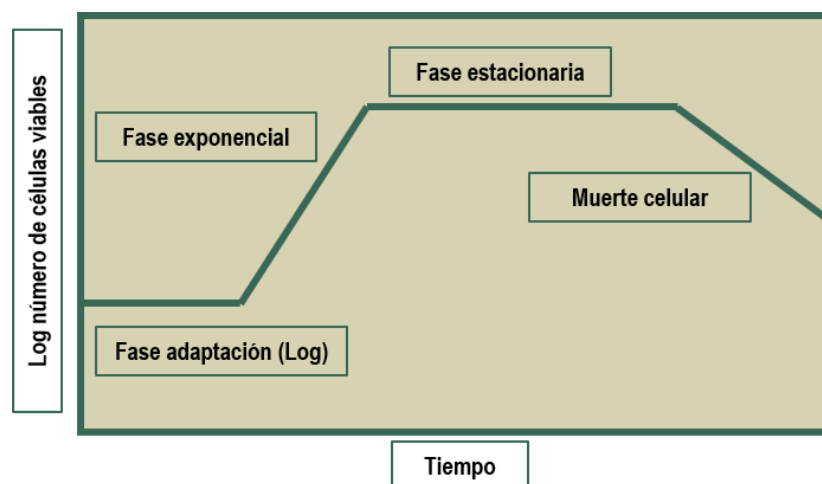
(Modificado de Heinz,2001)

Figura 4. Fisión binaria.

Los **bacteriófagos** infectan las células bacterianas y/o se replican hasta un número elevado que ocasiona la lisis de la célula (infección lítica) o, en algunos casos, se integran en el genoma del anfitrión sin producir su muerte (el llamado estado lisogénico). Algunos bacteriófagos lisogénicos portan genes toxigénicos. El bacteriófago X permanece en estado lisogénico mientras continúe la síntesis de una proteína represora, y evita que el fago abandone su estado de integración y se replique independientemente del cromosoma del anfitrión. Esta reacción se desencadena cuando la radiación u otro factor daña el ADN de la célula anfitriona o bien cuando la célula es incapaz de continuar

fabricando nuevas moléculas de la proteína represora, señal de que la célula anfitriona no está sana y no representa un lugar adecuado para el proceso de replicación vírica (Murray et al., 2021).

Cuando se añaden bacterias a un medio de cultivo, antes de empezar a dividirse ha de transcurrir un cierto tiempo de adaptación al nuevo ambiente. Este intervalo se conoce como fase de latencia del crecimiento. En cambio, durante la llamada fase logarítmica o exponencial, las bacterias se dividen y duplican su población a intervalos regulares hasta alcanzar el máximo nivel posible según el tipo de medio y las condiciones imperantes. El número de bacterias aumenta a razón de 2^n , donde n representa el número de generaciones (duplicación del número de bacterias). Finalmente, los metabolitos del cultivo se agotan o bien aparece en su seno alguna sustancia tóxica; en ese momento, las bacterias interrumpen su crecimiento y pasan a la llamada fase estacionaria. Generalmente las curvas de crecimiento se construyen en papel semilogarítmico, en el cual uno de los ejes corresponde al logaritmo del número de bacterias, y el otro al tiempo en escala aritmética; este procedimiento da una curva simétrica (Murray *et al.*, 2021). Figura 5 representa un ciclo de crecimiento que incluye las fases de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte.



(Modificado de Rodríguez & Chambi, 2019)

Figura 5. Curva de crecimiento.

5.3 Normas de bioseguridad en el laboratorio.

El laboratorio de microbiología debe ser un lugar seguro, eficiente y cómodo para los trabajadores y agradable para los visitantes; según la norma **ISO 15189**, debe disponer de un espacio suficiente, de forma que su carga de trabajo se pueda realizar sin comprometer la calidad ni la seguridad de todo el personal, trabajador o visitante. Además, debe optimizar la comodidad de sus ocupantes, respetar la privacidad del paciente, controlar el acceso a las distintas zonas del laboratorio y contar con un lugar de almacenamiento que permita asegurar la continua integridad de las muestras, manuales y reactivos. En el diseño de las instalaciones deben converger las necesidades de los especialistas, técnicos y demás personal que desarrolla su actividad laboral en este entorno, sin olvidar a los pacientes, sus acompañantes y demás visitas (Alados *et al.*, 2010).

La **OMS** entiende por bioseguridad al conjunto de normas y medidas destinadas a proteger la salud del personal frente a riesgos biológicos, químicos o físicos a los que esté expuesto durante el desempeño de sus funciones. De igual manera, el organismo también hace extensible el concepto de bioseguridad a los pacientes y al propio medio ambiente. Llevado el concepto al mundo del laboratorio, la OMS ya publicó en 1983 un 'Manual de bioseguridad en el laboratorio', destinado a proporcionar "orientación práctica sobre las técnicas de bioseguridad a los laboratorios de todos los niveles". Desde entonces, el texto ha servido como manual de cabecera en cuanto a los "pilares fundamentales de la bioseguridad en el laboratorio": las técnicas microbiológicas apropiadas y el correcto uso del equipo de bioseguridad por parte del personal. De este modo, en 2005 se lanzó una tercera edición el "Manual de Bioseguridad en el laboratorio", con la intención de que "siga sirviendo de estímulo para que los países implanten programadas de seguridad biológica y códigos de prácticas nacionales para la manipulación sin riesgo de material potencialmente infeccioso".

La Norma **ISO 9001:2015** elaborada por la Organización Internacional para la Estandarización (International Standardization Organization o ISO por sus siglas en inglés), determina los requisitos para un Sistema de Gestión de la Calidad, que pueden utilizarse para su aplicación interna por las organizaciones, sin importar si el producto y/o servicio lo brinda una organización pública o empresa privada, cualquiera que sea su rama, para su certificación o con fines contractuales. La Organización Internacional de Estandarización es un organismo independiente, no gubernamental que actualmente reúne a más de un millón de empresas y organizaciones en más de 170 países miembros alrededor del mundo. Esta organización se creó luego de la Segunda Guerra Mundial tras la reunión en Inglaterra de delegados de 25 países para coordinar y unificar estándares mundiales en febrero de 1947.

5.4 Esterilización y desinfección.

El descubrimiento de la penicilina en 1929 (Fleming, 1929) y su posterior introducción en clínica supuso una verdadera revolución en el tratamiento de la patología infecciosa. Desde entonces, se han incorporado a la práctica clínica decenas de familias de antimicrobianos, con actividad frente a bacterias, hongos, parásitos y virus. Las diferencias estructurales entre las bacterias y las células superiores hacen que la afinidad de los antimicrobianos de interés clínico por las dianas procarióticas sea mucho mayor que por las de sus homólogas eucariotas, disminuyendo así el riesgo de efectos adversos. Las principales diferencias entre las células bacterianas y las eucariotas incluyen en las primeras (Calvo & Martínez, 2009): a) existencia de un único cromosoma en la bacteria, que no está rodeado de membrana nuclear y se halla en contacto directo con el citoplasma (por tanto, muy accesible a los antibióticos que actúan sobre la síntesis de ADN); b) presencia de ribosomas del tipo 70S, y c) presencia de una pared celular con peptidoglicano (excepto en *Mycoplasma spp.*), estructura que confiere forma y rigidez a la bacteria. Las bacterias Gram negativas ofrecen mayor resistencia que las Gram positivas a la entrada de antimicrobianos, pues poseen una membrana

celular externa, que rodea la capa de peptidoglucano. Esa membrana es una bicapa de lipídica que, a diferencia de las membranas eucariotas, contiene lipolisacárido, y desempeña un importante papel de barrera frente a determinados antimicrobianos (Nikaido, 2003). Desde el punto de vista molecular, los antimicrobianos de uso clínico ejercen su acción en algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas: inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos. Hay también otros antimicrobianos cuya función es proteger otros compuestos de las enzimas hidrolíticas bacterianas, como es el caso de los inhibidores de β -lactamasas (García, 2006). Atendiendo a su efecto antibacteriano, los antimicrobianos se han clasificado tradicionalmente en bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostáticos (sólo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano). Los límites de ambos conceptos se consideran en la actualidad un tanto difusos, como ya se recoge en otro número de EIMC (Martínez, 2008). Cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración que alcance en la diana, o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo. En general, son bactericidas los antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ADN, y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucósidos (Calvo & Martínez 2009). El concepto de asepsia hace referencia a la utilización de procedimientos que impidan el acceso de microorganismos patógenos a un medio libre de ellos, por ejemplo, mediante el lavado de manos, la instauración de técnicas de barrera o la limpieza habitual. Antisepsia es el conjunto de procedimientos o actividades destinados a inhibir o destruir los microorganismos potencialmente patógenos. Para la implementación de la antisepsia se usan los biocidas, tanto en piel y tejido humanos (antisépticos) como en objetos, superficies o ambiente (desinfectantes). La revolución terapéutica que supuso el descubrimiento de

los antibióticos hizo que los biocidas pasaran a un segundo plano. La emergencia del grave problema de la multirresistencia bacteriana, que nos sitúa en una «era preantibiótica», hizo que volvieran a adquirir importancia. La esterilización, otra piedra angular de la antisepsia, tiene como objetivo la eliminación de cualquier microorganismo, nocivo o no (Hernández *et al.*, 2014).

- **Descontaminación** es el procedimiento que se utiliza para disminuir la carga bacteriana de los objetos supuestamente contaminados para su manejo seguro, mediante sustancias de efecto biocida reconocido.
- **Limpieza**, es la eliminación del material extraño (polvo, tierra, detritus orgánicos, etc.) de la superficie inerte o viva, y que, en su efecto de barrido, elimine también a los agentes biológicos superficiales. El agua, el jabón o el detergente y el secado posterior son los elementos básicos del proceso. La temperatura y la calidad del limpiador químico, que incluye desincrustantes, ph del medio y la técnica de lavado son determinantes en la actividad de limpieza del material inerte.
- **Desinfección**, se lleva a cabo por medio de biocidas o germicidas, sustancias químicas antimicrobianas cuyos mecanismos de acción y resistencia son muy similares a los de los antibióticos. Esta similitud está generando inquietud por la posibilidad de cruce de información genética que agrave el problema de las resistencias bacterianas. La mayoría de los biocidas pueden actuar como antisépticos, aplicados sobre piel y tejidos, o desinfectantes, sobre materiales inanimados. El espectro de acción de los germicidas depende de las características propias del producto y de factores externos controlables: temperatura, concentración, tiempo de exposición, etc.
- **Desinfectante**, procedimiento que logra un efecto bacteriostático, pero no actúa generalmente sobre las formas resistentes bacterianas. Un desinfectante es aquel que se utiliza en objetos o ambiente inanimado.

- **Antisepsia**, procedimiento que pretende, mediante el empleo de sustancias químicas, la disminución de microorganismos (acción biocida) o impedir su proliferación (acción biostática). A diferencia de los desinfectantes, su baja toxicidad relativa permite que se puedan aplicar sobre la piel y las mucosas.
- **Antiséptico**, se define igual que el desinfectante, aunque en este caso el término se utiliza para ambiente animado (organismo vivo) (Rodríguez, 2006).
- **Esterilización**, procedimiento que no admite la presencia de agentes biológicos. Esta pretensión de negación absoluta está sujeta a la cinética del proceso, y depende del control estricto del agente esterilizante, del tiempo de acción, de la biocarga presente y de sustancias o eventos que puedan interferir en la acción. El control estricto de estos parámetros, así como las condiciones de envoltura y almacenamiento del material supuestamente estéril, garantizan la eficacia real del proceso (Hernández *et al.*, 2014).

5.5 Medios de cultivo.

Los medios de cultivo constituyen el micromundo de los microorganismos en condiciones de laboratorio, intentando simular su hábitat natural en relación con la satisfacción de sus necesidades, es por eso que cada medio de cultivo debe ser diseñado de acuerdo con las exigencias del microorganismo en cuestión (Gómez & Bastida, 2006). Son una herramienta fundamental en los laboratorios de Microbiología. Desde la época de Koch hasta hoy en día se ha incrementado enormemente el arsenal de medios de cultivo con que cuentan los microbiólogos. La responsable directa de tal incremento de los medios de cultivo es la expansión de la microbiología desde la medicina hacia la agricultura, la alimentación y la industria farmacéutica (Burguet & Castillo, 2013).

5.5.1 Componentes

De una forma muy general, se puede decir que los medios de cultivo se componen de: Una *fente de carbono*, normalmente son azúcares sencillos como, por ejemplo, glucosa, lactosa, etc., pero existen también algunos organismos que usan CO_2 (en este caso serían autótrofos, al igual que las plantas). Una *fente de nitrógeno* se suelen usar proteínas parcialmente hidrolizadas, peptonas. *Otros componentes*, como K^+ , Na^+ , vitaminas, etc. *Amortiguadores de pH* (soluciones tampón o buffer) son sustancias que ayudan a mantener el pH del medio de cultivo dentro de un rango adecuado para el crecimiento de los microorganismos. Por ejemplo, suelen usarse como tampones los fosfatos disódicos (Na_2HPO_4) o monosódicos (NaH_2PO_4). Existen preparados comerciales (infusiones o extractos) obtenidos a partir de tejidos animales como cerebro, corazón o hígado. Y a veces se usan también fluidos corporales como la sangre animal. Todos estos productos contienen los componentes básicos necesarios para el crecimiento de microorganismos. Es importante tener en cuenta que hay ciertos tipos de microorganismos con requerimientos especiales para su desarrollo, que se añadirán al medio en caso necesario (Burguet & Castillo, 2013)

5.5.2 Clasificación

En la actualidad existe una variedad de medios de cultivo, incluyendo los medios líquidos o caldos y los medios solidificados con agar; entre los que podemos encontrar medios enriquecidos, medios selectivos, medios diferenciales y medios especializados (Mühlhauser & Rivas, 2014). En microbiología según la proporción de agar se clasifican de acuerdo con sus **características físicas**: medios líquidos no contienen productos solidificantes, usualmente se les llama caldos, favorecen la multiplicación de las bacterias cuando la muestra es muy pobre. Los medios semisólidos contienen una cantidad mínima de agar. Son usados para estudiar la motilidad de las bacterias. Los medios sólidos contienen agar es un carbohidrato obtenido de algas marinas, da consistencia sólida al medio por su acción como coagulante. No aporta ningún valor nutritivo. Generalmente el agente solidificante

es el agar al 1-2%. Estos medios inmovilizan las células y les permiten crecer y formar masas visibles y aisladas llamadas colonias. Cada medio de cultivo generalmente tiene una coloración diferente de otra (Mühlhauser & Rivas, 2014).

Por su **composición química** se utilizan dos grandes clases de medios de cultivo: los definidos y los complejos. Los medios definidos se preparan añadiendo cantidades precisas de productos orgánicos o inorgánicos puros a agua destilada. Por tanto, en un medio definido se conoce la composición exacta (tanto en sentido cualitativo como cuantitativo). Si se desea cultivar muchos microorganismos, no es esencial conocer la composición exacta de un medio. En estos casos, es suficiente con un medio complejo, e incluso puede resultar ventajoso los medios complejos se usan cuando se cultivan muchos microorganismos. Están hechos con hidrolizados de productos microbianos, animales o vegetales, como caseína (proteína láctea), carne (extracto de carne), soja (caldo trípico de soja), células de levadura (extracto de levadura), o algún otro de una larga serie de sustancias altamente nutritivas. Comercialmente vienen deshidratados y solo hay que rehidratarlos para obtener el medio de cultivo. No se conoce la composición nutricional exacta. Dentro de los medios complejos se encuentra la siguiente clasificación:

- Medios enriquecidos: Inicia como medio complejo y después se va complementando con sustancias de alto poder nutritivo como suero o sangre. Este medio se utiliza para el cultivo de microorganismos nutricionalmente exigentes, muchos de los cuales son patógenos.
- Medios selectivos: Contiene compuestos que inhiben el crecimiento de algunos microorganismos, pero no de otros. Por ejemplo, existen medios selectivos para el aislamiento de determinados patógenos,
- Medios diferenciales: Se añade un indicador, normalmente un colorante, que mediante un cambio de color nos señala que durante el crecimiento se ha producido una reacción metabólica determinada. Los medios diferenciales son útiles para distinguir las bacterias.

Por su presentación el medio sólido en placas se usa en cajas Petri generalmente para aislar colonias, medio sólido en tubo con agar inclinado ya que de esta manera los microorganismos tienen

una mejor disponibilidad de nutrientes, se utilizan para la conservación de microorganismos por periodos largos o en las pruebas bioquímicas, medio líquido en tubo se utiliza para la detención de microorganismos, medio semisólido en tubo generalmente se utilizan para observar la movilidad de los organismos (Mühlhauser & Rivas, 2014).

5.5.3 Preparación

Los medios de cultivo pueden adquirirse comercialmente listos para su uso o se pueden preparar en el laboratorio a partir de material deshidratado (el cual contiene los componentes necesarios para elaborar cada uno de los tipos de medios existentes). Para su elaboración hay que seguir las instrucciones dadas por el fabricante, que se especifican en el etiquetado del envase. Normalmente consiste en disolver el medio deshidratado en agua destilada, proceso que se conoce como reconstitución. La cantidad de agua será la que indica el fabricante. En el caso de medios que contienen agar como agente gelificante, hay que disolver agitando y calentando a la vez, debido a que el agar funde en torno a 100°C. Para ello se puede utilizar un termoagitador magnético (que evita una ebullición prolongada). Una vez reconstituido el medio de cultivo, hay que esterilizarlo para asegurarse de que no crecerá ningún microorganismo contaminante, ya que el objetivo del cultivo es determinar el crecimiento de los microorganismos presentes en muestras clínicas para su posterior identificación. La esterilización se realiza en una autoclave a 121°C durante 15-20 min. Los medios de cultivo en tubo se fraccionan antes de esterilizar y se introducen en la autoclave tapados con algodón graso y papel de aluminio. Sin embargo, los medios sólidos en placa se suelen esterilizar en recipientes grandes (botellas o matraces) con tapón de plástico o algodón graso. Posteriormente se recomienda esperar a que la temperatura baje a unos 45-50°C para fraccionarlo en placas, siempre cerca del mechero para evitar contaminación. El fraccionamiento consiste en depositar una pequeña cantidad en la placa, hasta que alcance unos 4 mm de altura. Dejar enfriar a temperatura ambiente hasta que solidifique por completo. Una vez sólido, se invierte (de tal forma que la superficie de apoyo

sea la tapa de la placa) y se almacena refrigerado a 4°C. Los medios de cultivo que incluyen en su composición sustancias termolábiles, es decir, que se alterarían tras someterse a un tratamiento con calor, necesitan un procedimiento alternativo para su esterilización. Generalmente se realiza filtración con membranas de un diámetro de poro de 0,2 a 0,45 µm. Los virus no se eliminan, pero sí las bacterias y hongos que pudieran contaminar el medio. Serían ejemplos de sustancias termolábiles el suero y determinados antibióticos.

5.5.4 Control de calidad

En general, se utilizan medios deshidratados, que se reconstituyen en el laboratorio, o medios ya preparados, listos para usar. En todos los casos deben ser conservados y procesados de acuerdo a las especificaciones del fabricante, teniendo siempre en cuenta la fecha de vencimiento y las condiciones de conservación y observando antes de usarlo las características físicas del mismo. Si se trata de medios en polvo verificar su hidratación, consistencia y/o color. **Control de esterilidad** al menos un 5% de las unidades de medios distribuidos en placas de Petri debe ser incubado a 35°C durante 24 horas. A los medios que contienen sangre conviene incubarlos 24 horas más a temperatura ambiente, para controlar el desarrollo de bacterias psicrófilas como *Pseudomonas fluorescens* o *Pseudomonas putida*. Cuando se detecte más de un 10% de placas contaminadas, debe desecharse todo el lote.. de **Apariencia y color** se debe observar que las características del medio preparado respondan a su composición. La presencia de algún precipitado, a menos que el medio contenga algún componente insoluble, indica algún problema en la técnica de preparación, en la calidad del agua utilizada o en la calidad del medio comercial. Si el precipitado desaparece cuando el medio se coloca a la temperatura de incubación, se considera que es satisfactorio. Si el color no es el esperado, se debe controlar el pH, cuyo valor debe caer dentro de $\pm 0,2$ unidades de lo especificado en la fórmula. Este control se realiza para cada lote de placas compradas o cada vez que se prepara el medio. Otro método es utilizar la cinta testigo, es un autoadhesivo que funciona como indicador

químico, que testifica el paso de envases y paquetes por los procesos de esterilización en vapor, el cambio de color en el indicador permite saber que el envase ha sido directamente expuesto al proceso de esterilización y para distinguir entre unidades procesadas y no procesadas, el cambio es de color verde a negro. **Control con muestras de referencia** cada lote preparado de medio de cultivo se debe probar antes de su uso rutinario, mediante la inoculación de microorganismos cuyo comportamiento se conoce, tanto para reacciones positivas, como negativas. Para esto pueden utilizarse cepas bacterianas control de la ATCC (American Type Culture Collection). Se debe guardar un registro de los resultados obtenidos (Herrera & Campos, 2005). **Control de pH** deberá controlarse que el medio preparado tenga el mismo pH que se especifica en la literatura o en las recomendaciones del fabricante. Se debe rehidratar con agua de pH controlado y efectuarse una medida inicial previa a la esterilización. La medición final se realiza a una de las placas preparadas después su esterilización y solidificación. **Control de crecimiento** el control se realiza en una de las placas preparadas y se utilizan cepas bacterianas de especies que sean exigentes para el desarrollo o que muestren características particulares en el medio. **Control de calidad de equipos** se deben basar en las normativas actuales para implantación de un sistema de calidad en laboratorios, comentando las características más sobresalientes de cada una de las posibilidades existentes (autorización administrativa por parte de las comunidades autónomas, certificación basada en la norma ISO 9001:2000 y acreditación basada en la norma ISO 17025) darle seguimiento a la normatividad nos permite la "identificación y trazabilidad" de los productos (todos los resultados deben poder ser trazables, es decir, si hay algo no conforme, el sistema debe garantizar que puede conocerse en cualquier momento, con los registros realizados, dónde está el origen de la no conformidad), "control de los procesos" tanto de análisis como de calidad en general (identificación de muestras, registros, quién informa, quién puede hacer modificaciones, etc.), "inspección y ensayo" (donde se exige la documentación de los procesos que se van a realizar mediante procedimientos normalizados de

trabajo y se requiere que el sistema permita conocer en cualquier momento el estado de ensayo de cada muestra. Se hace además hincapié en el "control de los productos no conformes", en la necesidad de controlar el sistema mediante "auditorías internas" de la calidad, realizadas por secciones por personal no implicado en el área que se va a auditar y generales por el responsable de calidad y que son muy útiles para conocer las desviaciones del sistema de calidad implantado y poder así emprender "acciones correctivas y preventivas". En los laboratorios es un punto importante el "control de los equipos de medición, inspección y ensayo" (disponiendo de un documento de funcionamiento y mantenimiento de cada equipo, así como un protocolo de calibración). Es importante definir un "plan de formación para el personal", así como una "definición de requisitos y funciones" de cada puesto de trabajo. Otro de los aspectos es lo que la norma denomina el "servicio posventa" y que para los laboratorios se resume en las acciones posteriores a la emisión del informe (Gimeno, 2003). **Criterios de aceptación** un lote de medio de cultivo será aceptado si todos los controles de calidad se encuentran dentro de los valores establecidos. Si alguno de los controles diera fuera de los valores permitidos, aún luego de realizar acciones correctivas para subsanarlo, se debe descartar ese lote de medio. **Estabilidad y condiciones de conservación** las placas preparadas deben ser almacenadas entre 2 y 8° C en bolsas selladas. Los frascos con medios que no vayan a ser utilizados en el momento deberán guardarse en un lugar seco al resguardo de la luz solar. Antes de su utilización se debe controlar que los medios de cultivo no presenten evidencia de descoloración, deshidratación, rotura del agar, volumen insuficiente, evidencias macroscópicas de crecimiento bacteriano o micótico u otros signos de deterioro. Se sugiere descartar los medios que presenten algunas de estas características. **Registros** anotar en la planilla de registro de preparación de medios, la fecha de preparación, el número de lote y la cantidad de medio preparado. Dejar asentado en la misma planilla los resultados de los controles de calidad realizados a cada lote, así como también las acciones correctivas, en caso de haber sido necesarias. **Deshidratación** no utilizar medios sólidos que

presenten la superficie resquebrajada o separada del borde de la placa. Para evitar este problema, las placas preparadas y controladas se envasan en bolsas de plástico y se conservan en heladera. Deben llevarse a temperatura ambiente antes de ser utilizadas. **Prueba de rendimiento del medio** antes del uso de cada nuevo lote deben realizarse controles con cultivos de referencia. Los medios de cultivos primarios deben ser sembrados con los microorganismos más exigentes, dentro de la gama de gérmenes para los que están destinados. Los medios selectivos deben probarse tanto con los microorganismos capaces de desarrollar en los mismos como con los que deben inhibir. Los medios de identificación deben probarse tanto con microorganismos que den las pruebas positivas como con aquellos que las den negativas. **Descontaminación de cultivos a descartar** cuando los cultivos se dan por finalizados y se quieren desechar, es necesario antes proceder a su descontaminación. Lo más conveniente es someterlos a esterilización por calor húmedo, 125°C, 30 minutos, en los envases que se han utilizado para el cultivo. Sólo así se pueden desechar los medios y el material descartable (descartados en bolsas de un determinado color) y recuperar los envases reciclables, por ejemplo, tubos de vidrio (descartados en bolsas de otro color y de un espesor de 150 micrones) (Lopardo, 2016).

5.5.5 Técnicas de inoculación

De acuerdo con la RAE inocular es la introducción artificial de microorganismos en un medio de cultivo con el fin de iniciar un cultivo microbiano; la importancia de obtener un buen cultivo de bacterias radica en que la morfología, reacciones de coloración, propiedades bioquímicas etc. de las colonias bacterianas puedan ser vistas al microscopio claramente. Para la proliferación de las colonias bacterianas deberás tener un medio de cultivo que le brinde todo lo que requieren en nutrientes y entorno.

Consideraciones importantes: Los materiales deberán estar en buen estado y esterilizados en caso de utilizar asas de inoculación considerar los diferentes tamaños y optar por la que nos funcione mejor,

se debe esterilizar el asa en la llama hasta que todo el filamento se haya puesto al rojo vivo y obligatoriamente debes dejarla enfriar unos segundos para evitar quemar el inóculo, es recomendable tomar una asada de muestra solamente ya que con eso es suficiente, la inoculación debe ser suave y fluido, de preferencia en una habitación sin corrientes de aire como en una campana de flujo laminar con previa esterilización con luz UV y tener a la mano un mechero. Para transferir los microorganismos, se recomienda.

- Medio líquido a medio líquido: utilizar pipeta Pasteur o graduada, o asa.
- Medio líquido a medio sólido: utilizar pipeta Pasteur o graduada, asa o hisopo.
- Medio sólido a medio sólido: utilizar asa o aguja.
- Medio sólido a medio líquido: utilizar asa o aguja.

Una vez finalizada la inoculación se debe rotular la caja o tubo con nombre de quién sembró, fecha y nombre o identificación de la muestra. Incubar siguiendo las recomendaciones del fabricante. Inoculación en **caja Petri** consiste en la dilución de un cultivo mediante el estriado en la superficie de un medio sólido. Los microorganismos se van quedando al hacer las estrías en diferentes partes de la superficie del medio de tal modo que quedarán células individuales que al multiplicarse darán lugar a una colonia. Método de inoculación por estría cruzada se toma la caja que se va a inocular cerca del mechero, se hacen una serie de estrías en una esquina de la caja, se da vuelta a la caja y con el asa se toca las dos últimas estrías una o dos veces y se hace una nueva serie de estrías, repitiéndose esto en el resto de la caja. Método de inoculación por estría masiva muy común de usar tanto en cajas Petri como tubos con agar, la finalidad es repartir el inóculo de forma en la incubación aparezcan colonias aisladas para su estudio individual. Se toma la caja que se va a inocular cerca del mechero, se hacen una serie de estrías en forma descendente y continuas, pareciera que haces zigzag. Método de inoculación semicuantitativo se traza una línea a la mitad de la caja; tomando el punto donde se inicia la línea, se comienza a estriar en forma perpendicular a esta de manera continua hasta llegar a la mitad de la caja, a continuación, se le da vuelta a la caja y se repite el procedimiento a partir de la

última estría hasta completar la caja. Por último, se realiza un estriado en forma contraria para obtener un crecimiento enrejado (Mühlhauser & Rivas, 2014). En la figura 6 se observan tres técnicas diferentes de inoculación bacteriana en caja Petri con medio de cultivo sólido, estos ejemplos son los más comunes en un laboratorio.

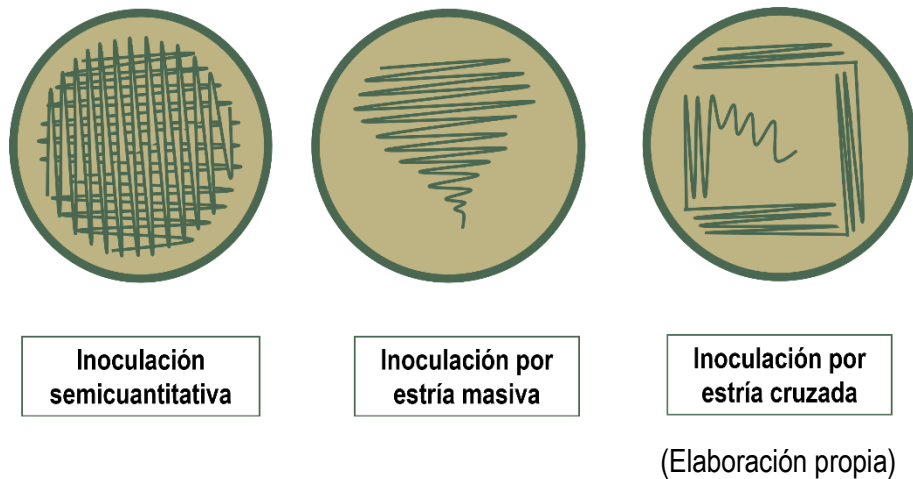


Figura 6. Técnicas de inoculación en caja Petri con medio sólido.

Inoculación en tubo el medio de cultivo en tubo puede ser sólido, líquido o semisólido. Se usa en caldo para desarrollar un crecimiento bacteriano, en pico de flauta para las pruebas bioquímicas o en agar nutritivo para la conservación de cepas. Método de inoculación por agitación se usa cuando el medio es líquido o “caldo” se agita el asa en él para desprender bien el inóculo. Método de inoculación por picadura con estría se introduce la aguja en el medio sólido en forma de pico de flauta picando la base del medio hasta la mitad y estriando el pico del medio. Método de inoculación por picadura punzar cuidadosamente en el centro del tubo conteniendo medio semisólido SIM sin llegar al fondo y retirar el hilo cuidadosamente tratando de recorrer el mismo camino de la punción. En la figura 7 se observan tres tipos diferentes de inoculación bacteriana dependiendo de estado del medio de cultivo.

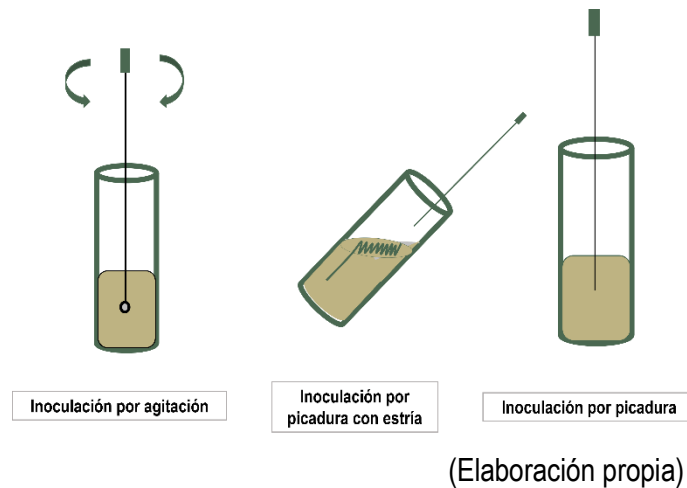


Figura 7. Técnicas de inoculación en tubo con medio de cultivo líquido, sólido y semisólido.

5.5.6 Técnicas de aislamiento

Cuando se examina en el microscopio una gota de agua de lluvia, se observa gran variedad de microorganismos; algunos de ellos podrían ser útiles al hombre, mientras que otros podrían ser patógenos. La separación de cada una de estas variedades es lo que se conoce como el aislamiento de microorganismos (Hernández, 2003). El objetivo del aislamiento es obtener colonias bien separadas de las que se conseguirá un cultivo puro; un cultivo puro es aquella población de microorganismos de un mismo tipo que, generalmente, se producen a partir de una sola célula (Hernández, 2003). Una vez obtenidos los cultivos puros se podrán estudiar las características macroscópicas, microscópicas, fisiológicas, etc. de un microorganismo en particular. Hay que tener en cuenta que siempre el aislamiento se da en un medio sólido. Los **métodos generales**, el método por agotamiento; se flamea el asa, se enfría y después se toma una asada de la colonia luego se realizan estrías en la placa en forma consecutiva sin recargar el asa. Método por estría cruzada tomar una asada de la muestra y realiza las estrías sobre un área pequeña se retira el asa, se quema a la llama, y luego de enfriarla en el interior de la placa se hacen nuevas estrías por otra zona tocando ligeramente la muestra sembrada anteriormente. Este proceso puede repetirse sucesivamente,

flameando y enfriando el asa al comienzo de las sucesivas siembras en estría, de acuerdo con la carga inicial de microorganismos. Método por dilución seriada; previa en solución fisiológica o caldo: Se toma la muestra para aislar y se la resuspende en solución fisiológica o caldo nutritivo, preparando luego diluciones seriadas decimales en condiciones asépticas. Se toman las diluciones y se estría con ellas una placa para cada una. En la dilución adecuada se obtendrán colonias aisladas. Método por extensión en superficie con espátula de Drigalski aquí también pueden prepararse diluciones decimales. Se deposita sobre la superficie de la placa una gota o 0,1 ml de una determinada dilución del cultivo de microorganismos y se extiende con ayuda de la espátula, previamente esterilizada por flameado, en todas las direcciones hasta que esté completamente seco. En la figura 8 se observan tres tipos diferentes de aislamiento de microorganismos en caja Petri con medio de cultivo sólido.

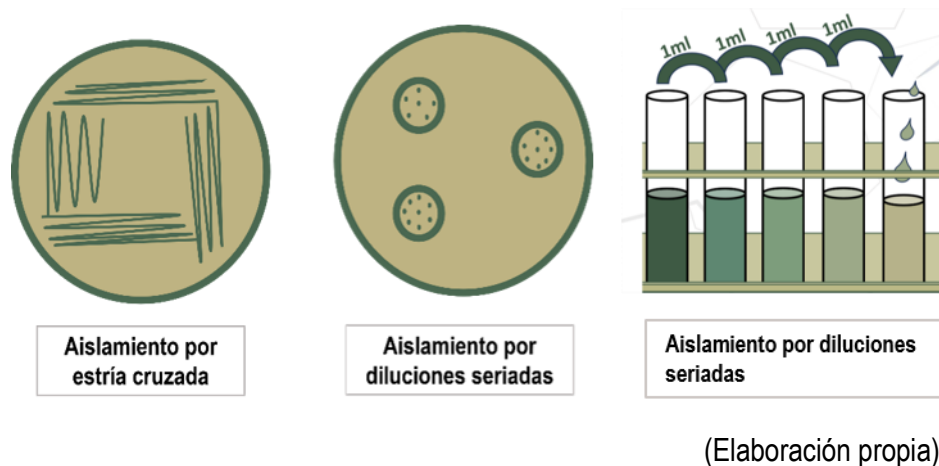


Figura 8. Técnicas de aislamiento.

Los **métodos especiales**, se basan en las características del microorganismo que se quiere aislar hay que tener en cuenta que puede haber gérmenes que poseen idénticos comportamientos frente a un mismo agente físico o químico. Método de calentamiento se utiliza para el aislamiento de gérmenes esporulados de los no esporulados. Método agregado de ácido tratamiento de la muestra con algunos de estos agentes ya que existen microorganismos que los resisten y otros que no. Método variaciones

de la temperatura de incubación, incubando a dos temperaturas distintas. Método de cambios en el pH existen unos pocos gérmenes que pueden crecer en medios con pH extremos. Método presencia de sales o colorantes debido a la capacidad de distintos microorganismos de crecer o no en medios con sales, sustratos, colorantes o antibióticos, se utilizan distintos medios de cultivo con el fin de lograr su aislamiento (Mühlhauser & Rivas, 2014).

5.6 Identificación bacteriana.

La identificación de bacterias tiene sus etapas, procedimientos y grado. Una vez llegada la muestra al laboratorio se examina directamente, en fresco o por medio de tinciones generales o específicas, luego, las bacterias aisladas en los distintos cultivos se identifican por diversos métodos para conocer género, especie y biotipos, y luego, si procede, se hacen con ellas otras pruebas. En microbiología clínica se ha basado, y se sigue basando, en la taxonomía clásica y tradicional de sus caracteres fenotípicos como morfología, aspecto en los medios de cultivo, propiedades fisiológicas, propiedades bioquímicas, degradación de macromoléculas, tipos de enzimas respiratorias, necesidades nutricionales, características quimiotaxonómicas, inhibición por diversas sustancias y reacción frente anticuerpos (Gobernado & López, 2003). Sin embargo, la identificación microbiana consta de métodos más avanzados como los métodos moleculares que permiten soslayar algunas de estas limitaciones, si bien su implementación no es universal. Este hecho se debe a un coste más elevado y al grado de especialización que se requiere para su aplicación, por lo que los métodos moleculares suelen estar centralizados en laboratorios o centros de referencia. Y recientemente los métodos basados en proteómica han irrumpido de manera importante en el campo del diagnóstico microbiológico y sin duda va a tener un gran impacto en la organización futura de los servicios de microbiología (Bou et al., 2011). En la figura 9 los dos componentes de una identificación bacteriana, en primera estancia la identificación fenotípica consiste en la realización de diversas pruebas bioquímicas, cada una de las cuales nos permite determinar visualmente algunas características específicas de las diferentes

especies bacterianas, por otro lado tenemos los métodos genotípicos, el genotipo es la información recogida en los genes de un organismo, mientras que su fenotipo es la manifestación / expresión de dicho genotipo en un determinado ambiente (Porres & Ruiz, 2018).

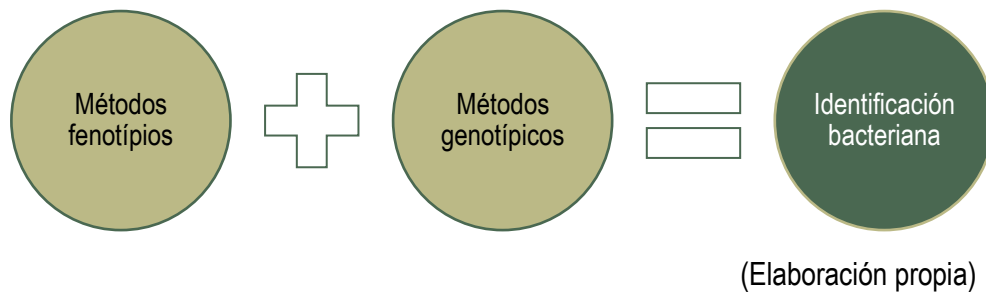


Figura 9. Componentes de la identificación bacteriana.

5.6.1 Métodos fenotípicos.

Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales, basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más asequibles. Los caracteres fenotípicos se extraen de la morfología bacteriana (tamaño, aspecto, inclusiones, esporas, cápsulas, flagelos, tipo de tinción), aspecto en los medios de cultivo (morfología, márgenes, elevación, superficie, textura, opacidad, pigmentación), propiedades fisiológicas (margen de crecimiento a distintas temperaturas, pH y cloruro sódico, y atmósfera de O₂ libre), propiedades bioquímicas (metabolismo de nitrógeno, utilización de hidratos de carbono, degradación de macromoléculas, tipo de enzimas respiratorias), necesidades nutricionales, características quimiotaxonómicas (tipo de pared celular, membrana celular, proteínas, lipopolisacáridos), inhibición por diversas sustancias (colorantes, antibióticos, fagos, bacteriocinas) (Gobernado & López, 2003). Todas las características fenotípicas conocidas son importantes y hay que tenerlas en cuenta cuando se inicia el proceso de identificación, pero en principio se seleccionan aquellas que se consideran pruebas primarias, que son rápidas y sencillas de realizar, nos arrojan características macroscópicas como la morfología en la tinción de Gram u otras tinciones, crecimiento en diferentes atmosferas de incubación, crecimiento

en varios tipos de medios de cultivo, oxidasa y catalasa. Luego se emplean pruebas bioquímicas permite identificar con un alto grado de precisión la mayoría de las bacterias clínicamente significativas para las cuales se utilizan diversos tipos de medios de cultivo de acuerdo con los requerimientos nutricionales de las bacterias. La figura 10 nos muestra del lado izquierdo a las pruebas primarias o también conocidas como “pruebas rápidas”, en el centro a las pruebas bioquímicas como los dos componentes del método fenotípico de la identificación bacteriana (Fernández *et al.*, 2010).

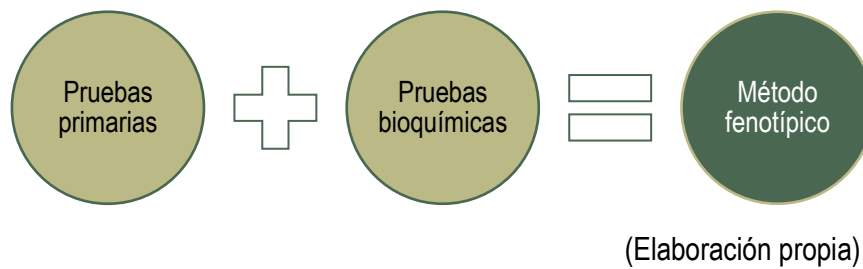


Figura 10. Componentes del método fenotípico de la identificación bacteriana.

5.6.1.1 Tinciones.

La utilización de los colorantes en los procesos de identificación en microbiología se fundamenta en las propiedades fisicoquímicas de estas sustancias. En el campo de la física, la óptica explica cómo todos los objetos son observables dependiendo de las longitudes de onda que se absorben y se transmiten dentro del denominado “espectro visible”. Dichas transiciones se deben, a su vez, a los compuestos químicos y a los movimientos electrónicos dentro de los átomos. Así mismo, cuando interacciona un colorante con una célula o un tejido, ocurren reacciones que dependen de grupos químicos funcionales denominados cromóforos (grupo funcional que cuenta con una alta densidad electrónica) y auxocromos (causa una absorción del cromóforo hacia longitudes de onda) dependiendo de los compuestos químicos que los constituyen, los colorantes pueden ser ácidos, básicos o neutros y esta connotación se debe a la parte activa del colorante y a la reacción que

ocasiona sobre las células microbianas. Los colorantes son sustancias que tienen la capacidad de teñir células, estructuras o tejidos; y de acuerdo con su origen, permiten hacer visibles los objetos microscópicos y transparentes, conocer su forma y tamaño, así como sus estructuras internas y externas. de acuerdo con su origen, se pueden clasificar en naturales, aquellos que son extraídos de plantas o animales, y artificiales, los que se extraen de minerales y son procesados en el laboratorio. (Corrales & Caycedo, 2020).

El proceso general de una tinción consta de primero la **fijación** tiene como objeto la inmovilización de las estructuras del material a estudiar en un estado lo más próximo posible al estado vivo y esta consiste en una muerte rápida de los microorganismos, debida a la coagulación de albúminas protoplasmáticas, la fijación es una medida de seguridad útil y necesaria porque que las bacterias vivas son generalmente impermeables a muchos de los colorantes utilizados, luego la **coloración** que es proceso de tinción de microorganismos, la **decoloración** tiene la finalidad de diferenciar si las bacterias son o no capaces de perder el colorante bajo la acción de situaciones drásticas, lo que permitirá diferenciar distintos grupos bacterianos, el **lavado** es la eliminación del exceso de colorante, mordente o decolorante, para evitar interferencias entre un producto y otro que podrían inducir a error, luego se aplica el **colorante de contraste** consiste en la utilización de colorantes generalmente básicos que teñirán al final aquellas estructuras que han sido decoloradas y, que por lo tanto, no han podido ser teñidas con el colorante inicial, finalmente se deberá realizar la **observación al microscopio** siempre se empezará por el objetivo de pocos aumentos para comprobar que la muestra está adecuadamente distribuida y no existen otros elementos, como por ejemplo cristales, restos de colorantes sin cristalizar, partículas de polvo, etc. Posteriormente se irá aumentando el objetivo. En la figura 11 se muestran los pasos que se realizan en una tinción de microorganismos (López *et al.*, 2014).

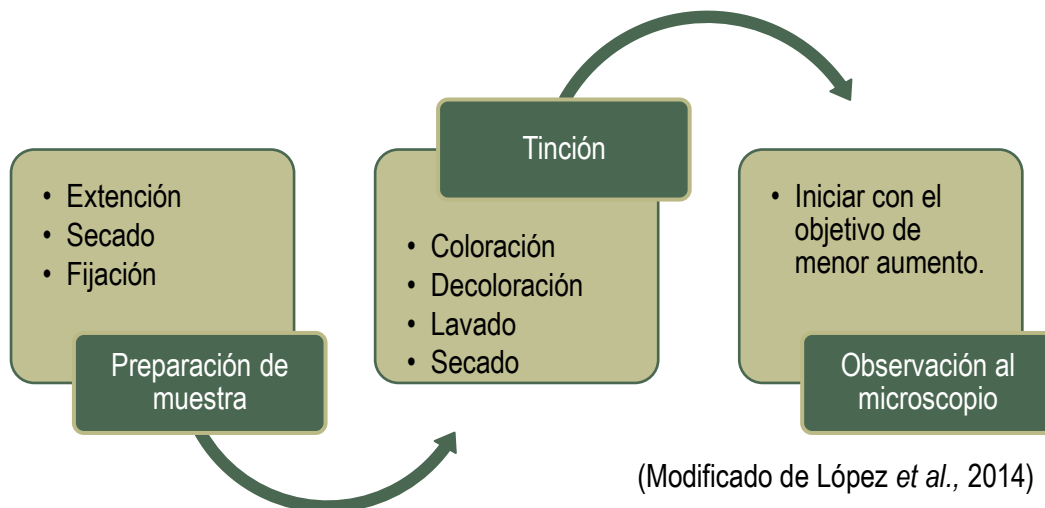


Figura 11. Pasos realizados en una tinción de microorganismos.

En la figura 12 se muestra que las tinciones se clasifican en tres grupos: La **tinción simple** en estas se utiliza un solo colorante, por lo que todas las estructuras celulares se tiñen con la misma tonalidad (azul de algodón lactofenol) se basa en el hecho de que las células tienen una composición química diferente a la de su entorno, de modo que ambos se comportan de forma diferente frente al colorante;

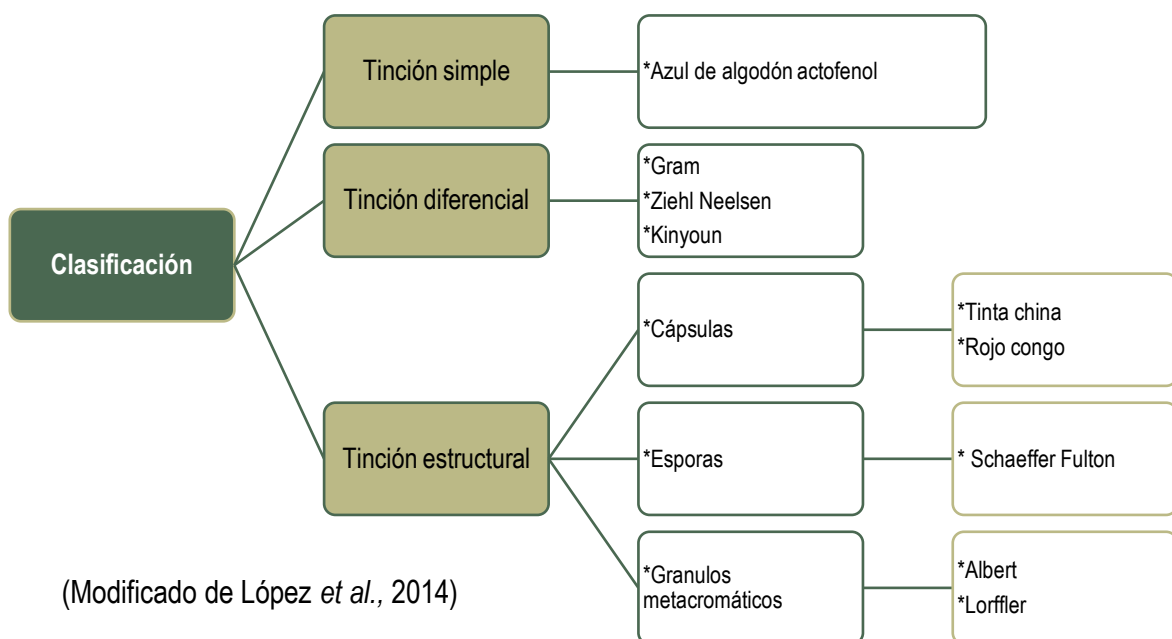


Figura 12. Clasificación de las tinciones.

La **tinción diferencial** en estas se utilizan varios colorantes combinados, las estructuras celulares se diferencian en función de los colorantes que fijan, se basan en el hecho de que distintos tipos de células tienen distinta composición química; y por lo tanto, reaccionan de forma diferente frente a una tinción, lo que permite clasificar los microorganismos en diferentes grupos. Los ejemplos clásicos serían la tinción de Gram o la de Ziehl-Neelsen; La **tinción estructural** se basan en el hecho de que existen estructuras celulares con una composición química determinada afín por uno de los colorantes que se aplican en la tinción, de modo que se tiñen selectivamente como las esporas, los flagelos y los gránulos metacromáticos, entre otros (Corrales & Caycedo, 2020).

5.6.1.1.1 Tinción de Gram

Esta tinción desarrollada por el doctor Christian Gram en 1884, es hoy la más utilizada en los laboratorios de bacteriología y permite, de acuerdo con la estructura y grosor de la pared bacteriana, agrupar las bacterias Gram positivas y en Gram negativas. Las *Gram positivas* poseen una capa gruesa de peptidoglicano y carecen de membrana externa, mientras que las *Gram negativas* tienen una capa más delgada de peptidoglicano y poseen una membrana externa (Cavallini *et al.*, 2005).

El cuadro 5 nos muestra diferentes tipos de metodologías aplicadas en la Tinción de Gram de acuerdo al autor (Toro, 2005).

Cuadro 5. Diferentes metodologías para realizar la Tinción de Gram.

Tinción de Gram			
Referencia	Forbes BA, Sahn D, Weissfeld A	Koneman EW, Allen SD, <i>et al</i>	Harvey RA, Champe PC
Solución de cristal violeta	10 a 30 s	1 min	1 min
Solución de Yodo	20 a 60 s	1 min	1 min
Alcohol-Cetona	10 s	Hasta que no se arrastre más cristal	

		violeta, usualmente 10 s o menos	5 s o dependiendo de la densidad de la muestra
Safranina	30 s	1 min	30 s

(González *et al.*, 2020)

5.6.1.2 Pruebas bioquímicas.

La completa caracterización de los bancos de microorganismos en las colecciones incluye diferentes procedimientos, entre los que se encuentran métodos de detección bioquímicos, moleculares y microbiológicos, acompañados de métodos de microscopía. El chequeo de bancos de células procariontas en general se basa en la identidad, pureza del cultivo y estabilidad genética. La confirmación de la identidad como especie y del genotipo-fenotipo puede incluir: análisis del crecimiento en medios selectivos, requerimientos nutricionales, resistencia a antibióticos y caracterización bioquímica; porcentaje de células que portan el plásmido de interés; número de copias del plásmido; secuencia de ADN plasmídica y caracterización de los mismos por restricción (Leslie & Barbara, 1991). Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en **medios de identificación** que contienen el sustrato a metabolizar. No obstante, algunas de estas pruebas pueden realizarse de forma rápida tras incubación de unas 2-6h; en general, se trata de reacciones enzimáticas cromogénicas o pruebas convencionales modificadas (hay discos o tabletas comercializados con sustratos cromogénicos para uso individualizado). La batería de medios empleados puede ser selectivos, diferenciales o ambos, recordemos que un medio selectivo

es aquel al que se han adicionado compuestos para inhibir selectivamente el desarrollo de determinados microorganismos, pero no de otros. Un medio diferencial, es aquel al cual se ha adicionado un indicador de alguna clase, comúnmente un colorante, que permite al clínico diferenciar entre varias reacciones químicas efectuadas durante el desarrollo. En la batería de pruebas realizadas para ayudar a identificar un organismo se pueden medir muchas reacciones bioquímicas, en efecto, estas pruebas miden la presencia o ausencia de enzimas que participan en el catabolismo de (los) sustratos del medio que se adiciono (arón) al medio diferencial. La fermentación de azucares se mide incorporando colorantes para pH, que cambian de color al acidificarse el medio. Se determina la producción de gas hidrogeno y/o de bióxido de carbono durante la fermentación de los azucares, observando la formación de burbujas de gas que quedan atrapadas en el medio de agar. La producción de sulfuro de hidrogeno se evidencia en un medio que contiene una sal férrica. Si se produce sulfuro, el hierro férrico forma un complejo con el H₂S para formar un precipitado negro de sulfuro de hierro. La utilización de ácido cítrico, un ácido de seis carbonos que contiene tres grupos carboxilo, se acompaña de una elevación del pH, se incorpora un colorante específico en el medio de prueba, que cambia de color al cambiar las condiciones a la alcalinidad. En el cuadro 6 se muestra que literalmente se han desarrollado centenares de pruebas diferenciales para el uso clínico, pero solamente se utilizan alrededor de 20 por rutina.

Cuadro 6. Pruebas bioquímicas.

Prueba	Principio	Procedimiento	Empleo más frecuente
--------	-----------	---------------	----------------------

Fermentación de carbohidratos	Acido y/o gas durante el crecimiento fermentativo con azucares o alcoholes azucarados	Medio de caldo con carbohidratos y fenol como indicador de pH; tubo invertido por gas	Diferenciación de bacterias Entéricas (también varios otros géneros o separaciones de especies con algunos azucares individuales).
Catalasa	Enzima que descompone el peróxido de hidrogeno, H ₂ O ₂ .	Añadir una gota de H ₂ O ₂ para espesar el cultivo y buscar burbujas (O ₂)	<i>Bacillus</i> (+) de <i>Clostridium</i> (-) de <i>Micrococcus</i> / <i>Staphylococcus</i> (+)
Utilización de Citrato	Utilización de citrato como única fuente de carbono, lo que origina alcalinización del medio	Medio de citrato con bromotimol azul como indicador de pH; buscar color azul intenso (pH alcalino)	<i>Klebsiella</i> - <i>Enterobacter</i> (+) de <i>Escherichia</i> (-), <i>Edwardsiella</i> (-) de <i>Salmonella</i> (+)
Descarboxilasas (lisina, ornitina, arginina)	La descarboxilación de aminoácido libera CO ₂ y amina	Medio enriquecido con aminoácidos, Bromocresol purpura indicador de pH. En pH alcalino, si hay acción enzimática, el indicador se vuelve púrpura.	Ayuda a determinar el grupo bacteriano entre las bacterias entéricas.
Producción de sulfuro de hidrogeno (H₂S)	El H ₂ S producido por la descomposición de aminoácidos sulfuro o reducción de tiosulfato	El H ₂ S detectado en medio rico en hierro a partir de la formación de sulfuro ferroso negro (muchas variantes: agar hierro de Kligler, agar hierro azúcar triple, también detectan la fermentación de carbohidratos	En bacterias entérica, para ayudar a identificar <i>Salmonella</i> , <i>Arizona</i> , <i>edwardsiella</i> y <i>Proteus</i> .
Prueba de Indol	El triptófano de las proteínas convertido en indol	Detectar indol en el medio de cultivo con dimetilamonobenzaldehído (color rojo)	Para distinguir <i>Salmonella</i> (-) de <i>Escherichia</i> (+) de <i>Klebsiella</i> - <i>Enterobacter</i> (-)
Prueba rojo de metil	Fermentadores ácido-mixtos que producen suficiente acido para	Medio caldo-glucosa. Añadir indicador rojo metilo para una muestra después de incubación	Para diferenciar <i>Escherichia</i> (+, cultivo rojo) de <i>Enterobacter</i> y <i>Klebsiella</i> (por lo

	descender el pH por debajo de 4.3		general, cultivo amarillo)
Reducción de nitrato	Nitrato como aceptor de electrones, reducido a NO ₂ o N ₂	Caldo con nitrato. Después de la incubación, detectar nitrito con ácido-a-naftilamina-sulfanílico (color rojo). Si es negativo, confirma que aún existe NO ₃ al añadir polvo de zinc, entonces NO ₃ a NO ₂ . Si no hay color después del zinc, entonces NO ₃ → N ₂	Para ayudar a identificar bacterias entéricas (por lo común +)
Prueba oxidasa	El citocromo c oxida al aceptor de electrones artificial; tetrametil o dimetil)- <i>p</i> -fenilenediamina. Sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas.	Clado o agar. Pueden detectarse en agar colonias oxidasas positivas por sumersión de la placa con reactivo para buscar colonias azules o cafés	Para separar <i>Neiseria</i> (+) de <i>Acinetobacter</i> (-). Para separar bacterias entéricas (-) de <i>pseudomonas</i> (+). Para ayudar a identificar <i>Aeromonas</i> (+)
Prueba de oxidación-fermentación (O/F)	Algunos microorganismos producen acido solo al crecer de modo aeróbico	Produccion de acido en la parte superior del tubo de cultivo que contiene azucar; agar suave empleado para restringir la mezcla durante la incuacion	Para diferenciar <i>Micrococcus</i> producción de ácido de <i>Staphylococcus</i> (ácido bio). Para caracterizar <i>Pseudonomas</i> (producción de ácido aeróbico) de bacterias entéricas (ácido anaeróbico)
Prueba de Voges-Proskauer	Acetona producida por la fermentación del azúcar	Prueba quimica para acetona utilizando alfa-naftol	Para separar <i>Klebsiella</i> y <i>Enterobcter</i> (+) de <i>Escherichia</i> (-). Para caracterizar miembros del género <i>Bacillus</i> .

(Modificado de Koneman, 2008)

5.6.2 Métodos genotípicos.

La ausencia de concordancia entre las características observables, morfológicas y/o fenotípicas del aislamiento en estudio y las correspondientes a la(s) cepa(s) de la especie tipo, hacen que los métodos fenotípicos realicen la identificación más probable y no definitiva. Para solventar los problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica —no todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica; una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos; y las limitaciones en la base de datos de bacterias correspondiente, entre otros— se han impuesto a los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos, los cuales se basan en observar su composición genética, estos análisis son muy usados por la filogenia. En la figura 13 se muestran los dos componentes del método genotípico de la identificación de microorganismos. (Bou *et al.*, 2011).

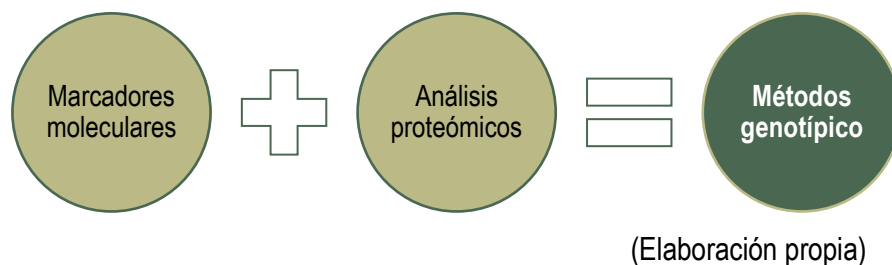


Figura 13. Componentes del método genotípico de identificación bacteriana.

5.6.2.1 Marcadores moleculares.

Los métodos moleculares de identificación bacteriana se basan en la determinación de la secuencia de genes altamente conservados, los cuales presentan regiones con variaciones características en cada género o especie bacteriana (Porres & Ruiz, 2018). Los primeros métodos de identificación molecular desarrollados fueron la hibridación ADN-ADN, análisis de secuencia de 16S rDNA, hibridación con sonda específica y análisis RFLP o ribotipado. Estos métodos moleculares se utilizan a menudo en asociación con la identificación microbiológica convencional. Con ADN-ADN hibridación,

porcentaje de homología entre la cepa de prueba y la cepa de referencia pueden ser determinado en el uso de filtro de membrana para la Fijación de ADN y radioisótopos para detección o usando microplaca y fotobiotina. Cuando el porcentaje de homología es superior al 70% entre los aislados y la cepa de referencia, y el fenotipo los criterios concuerdan con la definición de la especie, estas cepas se pueden agrupar en la misma especie. Se considera que el gen 16S rRNA es universalmente presente en las bacterias y muestra un alto grado de conservación de la secuencia. Ahora, existe un nuevo grupo de métodos moleculares para la Identificación de géneros, especies y cepas. La PCR, multiplex PCR, análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA), secuenciación de genes específicos (rec A, Idh, hsp 60 y piruvato quinasa) y la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) se utilizan para la detección, caracterización e identificación de género o especie. Otros métodos moleculares como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y la rep-PCR se utilizan para tipificar cepas de bifidobacterias. La PCR en tiempo real o Q-PCR será pronto una herramienta interesante para la detección, identificación y cuantificación de bifidobacterias en diferentes muestras y productos comerciales. Con las nuevas técnicas moleculares, ahora es más fácil tener una identificación, tipificación y cuantificación confiables de bacterias como *Bifidobacterium spp* (Ward & Roy, 2005).

5.6.2.2 Métodos proteómicos.

La proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). Existen diferentes técnicas proteómicas, siendo las más usadas aquellas basadas en la electroforesis y en la espectrometría de masas. La espectrometría de masas es una técnica de análisis de la composición de diferentes tipos de muestras, que consisten en la ionización de las moléculas que componen la muestra para la posterior separación de estas en función de su masa; el resultado que proporciona esta técnica se denomina espectro de masas o huellas químicas y consiste en un gráfico de los componentes detectados, por orden creciente de masa frente a su abundancia

relativa. El espectro de masas de forma de una fuente ionización que es la muestra a analizar, luego de un analizador de masas, que es el que acelera los iones y los separa en función de su masa o carga utilizando un campo eléctrico o magnético, finalmente de un detector, en él se produce una señal eléctrica por la llegada de los diferentes iones, la cual es procesada, ampliada y enviada a partir de las señales del espectro de masas (Porres & Ruiz, 2018).

5.7 Métodos de conservación microbiana.

Existen varios métodos para la conservación de microorganismos; todos buscan que las células sufran el daño mínimo y se preserven por el máximo periodo posible (Hernández, 2003). Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son: que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células y, por último, que estas células permanezcan genéticamente estables (Uruburu *et al.*, 2000). Debido al alto costo de las cepas de referencia y de los equipos utilizados en la conservación de microorganismos es necesario que cada laboratorio entrene a su personal para desarrollar sus propias colecciones de forma que estas cumplan con los principios de conservación planteados anteriormente. Por todo esto una colección de cultivos bien mantenida es un requisito indispensable para las buenas prácticas del laboratorio (Arencibia *et al.*, 2009). El creciente uso de cepas ha 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. En general, existen tres categorías en las que se agrupan los métodos de conservación dependiendo del tiempo en que permanecen viables las células, conservación a **corto plazo** la resiembra periódica, se basa en transferir el cultivo

del medio seco a uno fresco; 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. 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 (García, 2013). Conservación a **mediano plazo** agrupa las técnicas con las que se logran mantener la viabilidad de los cultivos entre 2 y 5 años. Se destacan en este grupo la desecación en diferentes soportes (arena, sílica gel, perlas de vidrio) donde la paralización del crecimiento se produce por eliminación del agua disponible, así como el almacenamiento en tierra, parafina líquida y la suspensión en agua estéril (destilada o de mar) (Weng et al., 2005). Conservación a **largo plazo** estos métodos garantizan al máximo la estabilidad genética, al evitar la aparición de generaciones sucesivas y por tanto son los más utilizados en microorganismos que han sido sujetos a manipulaciones genéticas las cuales los hacen diferentes de las cepas de origen y permiten mediante ellas evaluar medicamentos con alto potencial genotóxico y carcinogénico, a partir de la teoría bien abundada sobre las mutaciones, clasificándose como cambios bruscos ocurridos en el genotipo, y que son transmitidos a las generaciones siguientes, entre estos métodos se encuentran la congelación y la liofilización, siendo los más aplicables en cualquier laboratorio (Arencibia *et al.*, 2009).

5.8 Cepario.

El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en la agricultura y la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía y en la conservación del medio ambiente. En entornos de laboratorios con recursos limitados, el estudio de microorganismos a menudo implica el uso de cultivos vivos, los cuales deben ser viables durante los experimentos. Para garantizar su

disponibilidad y evitar la repetición costosa de procesos de caracterización e identificación en cada estudio, es crucial depositarlos en una colección de cultivos microbianos. Estas colecciones ofrecen servicios de conservación experta, acceso rápido y proporcionan cepas de referencia únicas y preservadas, asegurando la continuidad y eficiencia en la investigación microbiológica (Gutiérrez *et al.*, 2015). Las colecciones de cepas microbianas, presentes desde los primeros días de la bacteriología, han sido fundamentales en microbiología, ya sea para propósitos educativos o como archivos de referencia para investigación, taxonomía y solicitudes de patente. Aunque la microbiología se ha vuelto cada vez más molecular, la necesidad de estas colecciones no ha disminuido. Siguen siendo una fuente importante de continuidad histórica al preservar y distribuir cepas microbianas citadas en publicaciones, incluyendo microorganismos novedosos con potencial futuro en biotecnología (Bergey, 1989). Por todo esto una colección de cultivos bien mantenida es un requisito indispensable para las buenas prácticas del laboratorio. Los microorganismos tienen una tendencia inherente a mutar en cultivos de laboratorio, por lo que es muy importante el uso de procedimientos para mantenerlos viables y genéticamente estables. Una cepa es un cultivo puro proveniente de un progenitor determinado, al conjunto de cepas se les denomina “ceparios” (García, 2013) son fuentes de recursos genéticos cuyo propósito es la preservación de la diversidad biológica, garantizando su disponibilidad para actividades de docencia, investigación y comerciales (Gutiérrez *et al.*, 2015).

La historia de las colecciones de cultivos microbianos ha sido revisada por varios autores a lo largo de los años, destacando la primera colección establecida por el Profesor František Krašný en Praga en la década de 1880. Tras su muerte en 1911, la colección fue adquirida por el Profesor Ernst Pribham y posteriormente transferida a la Universidad de Viena y la Universidad Loyola en Chicago. Otra colección importante, el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), fue fundada en 1906 en los Países Bajos. Las principales colecciones de cultivos en todo el mundo tienen como comisión principal la preservación y distribución del germoplasma de importancia para la microbiología. Estas cepas

pueden ser utilizadas como referencia en investigaciones médicas, taxonómicas, ensayos o aplicaciones patentadas. La American Type Culture Collection (ATCC) es mencionada como un ejemplo destacado, habiendo evolucionado desde su inicio en la década de 1920 para convertirse en una fuente diversa de materiales biológicos, servicios y recursos de alta calidad utilizados por científicos en todo el mundo para mejorar la salud global y abordar desafíos de salud importantes.

Las colecciones microbianas, conocidas como "ceparios" y centradas en bacterias, son centros de recursos genéticos que preservan microorganismos para garantizar su disponibilidad en actividades de enseñanza, investigación y comercio. Originadas a finales del siglo XIX con el propósito de impulsar el desarrollo científico, la OCDE las reconoce como fuentes sustentables. Se destaca la importancia de preservar la diversidad biológica y distribuir equitativamente los beneficios, aunque estos centros son escasos, principalmente en Europa y Asia. Se alienta a las instituciones de investigación a promover el acopio y preservación de materiales biológicos. Los ceparios, depositarios de cepas y microorganismos aislados, requieren preservación para garantizar su viabilidad y estabilidad genética y fenotípica, sin variaciones respecto a las condiciones originales.

Cuadro 7. Algunas de las principales colecciones de cultivos bacterianos en el mundo.

Colección	Dirección
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110–2209 USA Telefono: 703–365–2700; Fax: 703–365–2701 Sitio web: www.atcc.org/
BCCM / LMG	<i>Belgian Coordinated Collections of Microorganisms</i> Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (RUG) K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent BELGIUM Telefono: 32–9–264 51 08 ; Fax: 32–9–264 53 46 E-mail: bccm.lmg@rug.ac.be Sitio web: www.belspo.be/bccm/
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i> (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig GERMANY Telefono: 49–531–2616 Ext. 0; Fax: 49 531–2616 Ext. 418 E-mail: help@dsmz.de

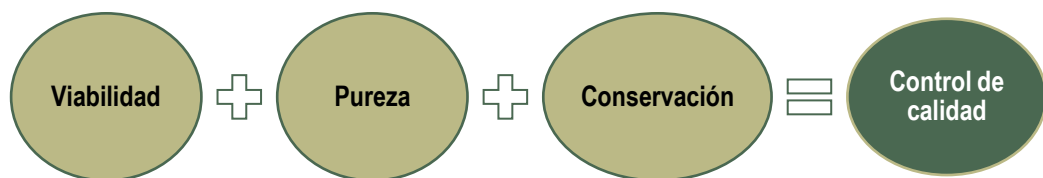
	Sitio web: www.dsmz.de
IFO	<i>Institute for Fermentation, Osaka</i> 17-85 Juso-Honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka, 532 JAPAN Telefono: 81-6-300-6555; Fax: 81-6-300-6814 Sitio web: wwwsoc.nacsis.ac.jp/ifo/index.html
NRRL	<i>Agricultural Research Service Culture Collection National Center for Agricultural Utilization</i> Research: 1815 North University Street, Peoria, IL 61604 USA Telefono: 309-681-6560; Fax: 309-681-6672 E-mail: nrrl@mail.ncaur.usda.gov . Sitio web: nrrl.ncaur.usda.gov
JCM	<i>Japan Collection of Microorganisms</i> RIKEN Hirosawa, Wako-shi, Saitama, 351-01 JAPAN Telefono: 81-48-462-1111; Fax: 81-48-462-4617 Sitio web: www.jcm.riken.go.jp
NCIMB	<i>National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Ltd.</i> 23 St. Machar Drive, Aberdeen, AB24 3RY Scotland, UNITED KINGDOM Telefono: 44-0-1224 273332; Fax: 44-0-1224 487658 E-mail: ncimb@abdn.ac.uk Sitio web: www.ncimb.co.uk
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i> PHLS Central public Health Laboratory 61 Colindale Avenue, London, NW9 5HT UNITED KINGDOM Telefono: 44-181-2004400; Fax: 44-181-2007874 Sitio web : www.ukncc.co.uk

(Modificado de Centro Mundial de Datos de Microorganismos)

5.8.1 Control de calidad del cepario.

La interpretación y el rigor de los resultados microbiológicos siguen dependiendo en gran medida de la calidad de las muestras y el procesamiento de las mismas dentro del Servicio de Microbiología (Sánchez *et al.*, 2019). Dada la tendencia inherente de los microorganismos a mutar en cultivos de laboratorio, se recomienda realizar inspecciones periódicas para mantener su viabilidad, estabilidad y pureza. La precisión, significado y relevancia clínica de los resultados proporcionados por los servicios de microbiología dependen de la correcta selección, recogida y transporte de las muestras microbiológicas, ya que esto optimiza su análisis e interpretación (Baron *et al.*, 2013). El control de calidad en microbiología se refiere a las prácticas operativas que permiten monitorear diariamente los

procedimientos del laboratorio, identificando errores en la ejecución de técnicas y problemas con los reactivos. Este control es parte integral de un programa que abarca la calidad total, mejora continua y aseguramiento de la calidad. Un programa completo debe incluir un Manual de Procedimientos, validación de metodologías y equipos, educación continua, bioseguridad y supervisión de los informes diarios. Se destaca la importancia de la correcta valoración de pruebas de laboratorio, agentes patógenos, conocimiento de la flora normal, taxonomía bacteriana e interpretación adecuada de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (Herrera & Campos, 2005b). El control de calidad garantiza la precisión de los resultados informados al aplicar ensayos que aseguran la viabilidad y pureza de los microorganismos. Utiliza técnicas fenotípicas, como tinciones y pruebas bioquímicas de identificación, junto con la inspección de equipos y supervisión del personal. Los resultados deben cumplir con el perfil morfológico y bioquímico específico del microorganismo. La figura 14 muestra la viabilidad, pureza y método de conservación como los componentes del control de calidad del cepario.



(Elaboración propia)

Figura 14. Componentes del control de calidad a un cepario.

5.8.2 Pruebas de viabilidad y pureza.

La **viabilidad** de las cepas se evalúa mediante el desarrollo del crecimiento y análisis de sus características macroscópicas típicas, a partir de la cepa de reserva a través de un subcultivo para obtener la cepa de trabajo. La recuperación de las cepas se evalúa cualitativamente dando un criterio de cumplimiento o incumplimiento en dado caso que el crecimiento sea ausente y se haya perdido la viabilidad. En dado caso, si y solo si la cepa de reserva pierde viabilidad, debe realizarse un repique a partir de la cepa madre y así obtener una nueva cepa de reserva. La temperatura de refrigeración

debe ser constante y uniforme para que la viabilidad de la cepa de reserva se mantenga hasta un periodo de 30 a 90 días. Cambios bruscos de temperatura pueden afectar directamente la viabilidad de la célula. Posterior a los 60 o 90 días si se observa la pérdida de la viabilidad o cambios fenotípicos de las cepas debe de generarse una nueva cepa de reserva a partir de la cepa madre. Es necesario realizar revisiones periódicas semanales para evaluar las características de las cepas y el medio de cultivo debido a que este último puede sufrir deshidratación o pérdida de nutrientes, así como acumulación de metabolitos tóxicos excretados por los microorganismos al medio de cultivo, en este caso es necesario realizar una nueva cepa de reserva partir de la cepa madre. En dado caso que la pérdida de viabilidad sea evidente al momento de generar la cepa de trabajo, se debe realizar una nueva siembra y evaluar la viabilidad de la misma, si permanece inviable realizar un pase a partir de la cepa madre para generar una nueva cepa de reserva (Neider, 2018). El cuadro 8 nos explica que si existe desarrollo microbiano se considera viable el microorganismo, caso contrario si no hay indicios de desarrollo se considera no viable el cultivo

Cuadro 8. Viabilidad de los microorganismos.

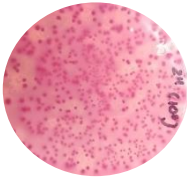
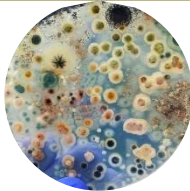
	
Ausencia de desarrollo microbiano	Presencia de desarrollo microbiano
No viable	Viable

(Elaboración propia)

En el manejo de muestras contaminadas o cultivos mixtos en los que se encuentran diversos microorganismos el primer paso es la separación de cada una de estas variedades es lo que se conoce como el *aislamiento de microorganismos* (Hernández, 2003). En biología, cultivo

axénico describe un cultivo en el que solo una especie, variedad o cepa de organismo está presente y completamente libre de todos los demás organismos (contaminantes). Un cultivo axénico se obtiene artificialmente en un laboratorio. La **pureza**, se determina mediante la demostración de la presencia de contaminantes bacterianos y fúngicos; la estabilidad genética se comprueba comúnmente por verificación de mutaciones listadas en los fenotipos. El cuadro 9 nos muestra la pureza de los microorganismos, del lado izquierdo tenemos un cultivo puro (también llamado cultivo axénico) ya que existe presencia de un solo tipo de microorganismo, por otro lado, tenemos un cultivo no puro (también llamado cultivo no axénico) porque se observan varias especies de microorganismos en el medio de cultivo. (Leslie & Barbara, 1991).

Cuadro 9. Pureza de los microorganismos.

	
Cultivo Puro (axénico)	Cultivo no puro (No axénico)
Aislado	No aislado

(Elaboración propia)

5.9 Definición de manual.

Gómez, V. (2010) que define un manual de laboratorio como una orientación escrita, una guía sobre los procedimientos prácticos que el estudiante debe realizar en un laboratorio, sirviendo de apoyo y aplicación al curso teórico; el manual contiene entonces aplicación de teoría, procedimientos y un manejo adecuado de equipos técnicos, que permiten el acercamiento a un laboratorio.

Por otro lado, Richaudeau (citado por Casallas, A. & Rache, L. 2009) define al manual como un material impreso, estructurado, destinado a utilizarse en un determinado proceso de aprendizaje y

formación, siendo entonces un medio útil para la enseñanza y con altas implicaciones pedagógicas y sociales. Este debe estar integrado de manera sistemática a un proceso de enseñanza y aprendizaje.

Podemos decir que un manual es un documento elaborado sistemáticamente que indicara las actividades a realizarse por los miembros de un organismo y la forma en que lo harán, para lograr una mayor eficiencia en el trabajo.

5.9.1 Objetivos de los manuales.

El manual pretende ser una guía, accesible y fácil de consultar, que oriente a los profesionales en la elaboración o adaptación de documentos basados en la evidencia que ayuden a la estandarización de la práctica clínica y a la toma de decisiones velando siempre por la calidad de la misma de forma que siga unos referentes establecidos (Carrión *et al.*, 2013). El propósito fundamental de los procedimientos consiste en lograr que las operaciones de naturaleza repetitiva se desarrollen siempre en la misma forma; dicho en otras palabras, es ejecutar las operaciones de un procedimiento de igual manera cada vez que se lleve a cabo (Parreño, 2002).

Otros objetivos de los manuales son:

- Presentar una visión de conjunto del organismo social.
- Precisar las funciones de cada unidad para deslindar responsabilidades, evitar duplicaciones y detectar omisiones.
- Coadyuvar a la ejecución correcta de las labores encomendadas al personal y propiciar la uniformidad en el trabajo.
- Permitir el ahorro de esfuerzos en la ejecución del trabajo, evitando la repetición de instrucciones y directrices.
- Proporcionar información básica para la planeación e implantación de reformas.
- Facilitar el reclutamiento y la selección de personal.

- Servir de medio de integración y orientación al personal de nuevo ingreso, facilitando su incorporación a las distintas áreas
- Propiciar el mejor aprovechamiento de los recursos humanos y materiales.

5.9.2 Importancia de los manuales.

Los manuales constituyen medios valiosos para la comunicación, fueron concebidos para registrar y transmitir, sin distorsiones, la información referente a la organización y funcionamiento de una empresa, así como la de las unidades administrativas que la constituyen. La necesidad de contar con manuales se ha hecho imperativo no solo por un ordenamiento, o por la moda, sino debido al creciente volumen de las operaciones, al incremento de personal, a la adopción de técnicas modernas y la complejidad de las mismas. Todo ello hace imprescindible el uso de instrumentos administrativos que faciliten la actuación y el desarrollo de las funciones de la empresa, así como para proporcionar la información que requieren los administradores en el cumplimiento de sus obligaciones y deberes principales. Los manuales representan un medio de comunicación de las decisiones de la administración, concretamente a objetivos, funciones, relaciones, políticas, procedimientos etc. En esencia, los manuales son un recurso para ayudar a la orientación del personal en la ejecución de sus tareas. Es una gran ayuda para el personal que las instrucciones sean definidas, para aclarar funciones y responsabilidades, definir procedimientos, fijar políticas, proporcionar soluciones rápidas a los malentendidos y mostrar el modo en que puede contribuir el personal en el logro de los objetivos organizacionales, así como sus relaciones con otros empleados. La uniformidad, la accesibilidad y la reflexión están entre las ventajas de los manuales (Rodríguez, 2012).

5.9.3 Clasificación de los manuales.

El tipo de manual que se elaborará se determina respondiendo a la siguiente pregunta:

¿Cuál es el propósito que se desea lograr?

En el cuadro 10 se representa la clasificación de los manuales de acuerdo con su contenido, por su función específica y por su ámbito de aplicación.

Cuadro 10. Clasificación de los manuales

Clasificación de los manuales	
Por su contenido	<p>Incluye:</p> <ul style="list-style-type: none"> *De historia del organismo *De organización *De políticas *De procedimientos *De contenido múltiple (es cuando incluye más de dos categorías) *De adiestramiento o instructivo *Técnicos
Por su función específica	<p>En este grupo entran los manuales que rigen a una determinada función operacional. El grupo incluye los manuales:</p> <ul style="list-style-type: none"> *De producción *De compras *De ventas *De finanzas *De contabilidad *De personal *Generales (más de dos funciones operacionales)
Por su ámbito de aplicación	<ul style="list-style-type: none"> -General. Incluyen al organismo en su conjunto: <ul style="list-style-type: none"> *Organización *Procedimientos *Políticas -Específico. Incluyen información de una unidad orgánica: <ul style="list-style-type: none"> *Reclutamiento y selección *Auditoría interna *Políticas de personal *Procedimientos de tesorería

(Modificado de Rodríguez.2012)

5.9.3.1 Manual de procedimientos.

El proceso tiene un carácter genérico y de él se derivan tantos procedimientos como sean necesarios. De acuerdo con la Real Academia Española, la diferencia entre proceso y procedimiento consiste en que el primero comprende los insumos, el proceso de transformación y los resultados de valor, mientras que el segundo es el método de trabajo diseñado para la ejecución de un conjunto de operaciones y tareas que detallan las actividades de un proceso de transformación de insumos en resultados.

De acuerdo con la norma ISO 9001:2008 todas aquellas organizaciones que pretenden demostrar su capacidad para producir bienes y servicios que satisfagan los requerimientos de sus clientes y aspiren a aumentar esa satisfacción, deben “establecer, documentar, implementar y mantener un sistema de gestión de calidad y mejorar continuamente su eficacia” (Crosby, 1990). Un manual de procedimientos es un documento administrativo que contiene información relacionada con el conjunto de operaciones o actividades que deben realizarse para la generación de bienes y servicios, detalla las operaciones o actividades que deben ejecutarse de manera secuencial y cronológica para dar cumplimiento a una función que coadyuve a la generación de bienes o servicios, considera las unidades administrativas y puestos de carácter interno o externo a la organización, que intervienen en los procesos de trabajo, este manual es aprobado por el titular del organismo auxiliar y con el visto bueno de las autoridades normativas (Quiroga, 1994). Es fundamental que en toda empresa o institución se tenga un método de trabajo a utilizar, la forma de desarrollar el trabajo, los diagramas de procesos, la definición y simbolización de las distintas actividades, los diagramas de operaciones, los diagramas de análisis; unidos a la actividad del trabajo van a definir cómo va a llevarse a cabo la fabricación de los productos, es así que se hace necesario la elaboración de manuales de procedimientos, los mismos que ayudan a optimizar tiempo y esfuerzos; los manuales de procedimientos son importantes por que establecen

formalmente los métodos y técnicas de trabajo que deben seguirse para la realización de las actividades administrativas; porque precisan responsabilidades operativas para la ejecución, control y evaluación de las actividades; registrar en forma ordenada, secuencial y detallada, las operaciones que se efectúan, los órganos que intervienen y los formatos que se utilizarán en la ejecución de las actividades; y porque evitan el desperdicio de tiempo y la duplicidad de funciones (Parreño, 2002).

5.9.3.1.1 Criterios para su realización

El contenido de los manuales de procedimientos es diferente en cada organización; varía según el ámbito de aplicación y alcance. No obstante, para estandarizar los apartados de los manuales de procedimientos se deberá adoptar el modelo siguiente:

Introducción; deberá contener una explicación clara y sencilla del manual, destacando su relevancia de igual manera deberá contar con el objetivo del manual. **Organigrama;** interpretación de la estructura básica de la organización, en la cual se explican cosas como el tipo de organización, amplitud de la centralización o descentralización y relación entre personal de línea y el asesor. **Gráficos;** contiene diagramas de flujo con su respectiva simbología, en el que se identificará cada paso y su descripción del procedimiento. **Estructura procedimental;** es la descripción narrativa de los procedimientos. **Formas;** por lo general rediseñadas y planeadas, también instructivos de las formas. **Políticas de organización;** relacionadas con aspectos fundamentales como, planeación, comunicaciones, control y desarrollo del personal. Registro de ediciones; para tener a la mano las actualizaciones. **Distribución;** física o virtual. **Validación;** por los titulares (Parreño, 2002).

5.10 Manual digital en el software Genially.

La innovación educativa implica cambio; pero cambio deliberado, intencional, voluntario y dirigido a un fin. Derivado de sus definiciones nominales, la innovación se entiende como la incorporación de algo nuevo dentro de una realidad existente, en cuya virtud ésta resulta modificada, es decir, la

innovación hace referencia, por un lado, a la actividad innovadora, y por el otro, al resultado de la actividad en sí misma (Ruiz & Ortega, 2014). Ahora bien, el control de calidad es un conjunto de pruebas establecidas por el usuario o fabricante de un sistema, para ayudar a mantener estándares que se han fijado desde el inicio de su funcionamiento, además de disminuir la probabilidad de que los valores salgan de tolerancia. Con los controles de calidad rutinarios se pueden detectar fallas en el sistema y corregirlas a tiempo, evitando así un gasto excesivo de recursos en el caso que se llegara hacer más grande la falla (Galván, 2012). Por lo tanto, un laboratorio de Microbiología debe poner en práctica una serie de acciones que le permitan asegurar una adecuada práctica en el aislamiento, identificación y caracterización de agentes etiológicos y su correspondiente prueba de susceptibilidad como una guía de la terapia. Esto significa que deben ser controlados una serie de factores y eventos, tales como el monitoreo de medios de cultivo, reactivos, instrumentos, procedimientos y que se debe poner especial énfasis en la capacitación permanente del personal (Herrera & Campos, 2005).

La App **Genially** es un software para crear contenidos interactivos. Permite crear imágenes, infografías, presentaciones, microsites, catálogos, mapas, entre otros, los cuales pueden ser dotados con efectos interactivos y animaciones de manera fácil y rápida, de uso individual o en equipo. Este software fue lanzado en 2015 por Juan Rubio, Luis García y Chema Roldán. En la educación asegura captar la atención de los alumnos desde el primer minuto ya que funciona como una herramienta educativa y por lo tanto una herramienta útil para organizar y difundir la información de un manual de procesos que nos asegura:

1. Disponibilidad ya que se encuentra en la nube, pudiendo tener acceso en cualquier momento.
2. Requiere conexión a internet.
3. No es necesaria su instalación al PC, se accede desde cualquier dispositivo móvil.
4. Es una herramienta digital gratuita, se requiere tener el link para poder interactuar con la app.

5. También cuenta con una versión premium para creaciones, se identifica porque cuenta con un icono de estrella amarilla.

Para crear un manual en este software lo primero que se debe hacer es acceder a un navegador y buscar el sitio www.genial.ly luego, solo se deberá registrar mediante una dirección de e-mail y una contraseña, una vez registrados se tendrá acceso a un panel de creación de presentaciones. A la izquierda de la pantalla hay un apartado que dice "Inspiración" despliega una serie de animaciones creadas por otras personas, y es modificable, se puede partir de aquí o bien, iniciar desde cero, seleccionando la primera opción "Crear genially", en esta parte se elige el tipo de contenido (curriculum, infografía, quizz, presentación, evento, test...entre otros). En el costado izquierdo se encuentran todos los elementos para diseñar la presentación como:

- Texto: Tipografía de letras
- Imagen: insertar imágenes desde un dispositivo, imágenes y gifs de la página o bien desde un enlace.
- Recursos: Iconos, formas conectores y flechas, ilustraciones, siluetas, graficas interactivas y tablas.
- Elementos interactivos: Botones en diferentes diseños, widgets y graficas interactivas.
- Preguntas interactivas: Despliega diferentes diseños de preguntas interactivas.
- Smarthblocks: Diagramas animados, diferentes presentaciones para datos, tablas o gráficas, así como diseños para procesos o líneas del tiempo, galería, mapas interactivos, entre otros elementos que ayudarán a organizar la información de manera fácil, rápida y con un diseño llamativo.
- Insertar: puedes insertar audios desde un dispositivo, grabar el audio o bien pegar el enlace del audio provenientes de otras aplicaciones de audio como Spotify, YouTube, Soundcloud, Audioboom, Mixcloud y Deezer

- Fondo: cambiar el diseño del fondo del temple.

Al finalizar el proceso de creación se guarda y comparte el enlace del temple, que solo se podrá utilizar como herramienta y no es modificable a menos que sea el autor.



Figura 15. Logo del software Genially.

5.10.1 Importancia de un manual digital.

Los manuales didácticos en línea desempeñan un papel crucial en el ámbito de la educación e investigación, ya que ofrecen una plataforma accesible y dinámica para la adquisición y difusión de conocimientos. A continuación, se detallan algunas razones destacadas que resaltan su importancia:

Accesibilidad global: Los manuales didácticos en línea permiten un acceso global a la información educativa. A través de la web, estudiantes e investigadores de todo el mundo pueden beneficiarse de recursos educativos sin restricciones geográficas, facilitando así la difusión del conocimiento a una audiencia más amplia; **Actualización continua:** Los manuales en línea pueden actualizarse fácilmente para reflejar los avances más recientes en investigación y pedagogía. En un entorno en constante cambio, esta capacidad de actualización rápida garantiza que los materiales educativos estén siempre al día y sean relevantes para los usuarios; **Interactividad y multimedia:** Los manuales en línea ofrecen la posibilidad de integrar diversos formatos multimedia, como videos, animaciones y simulaciones interactivas. Esta característica enriquece la experiencia de aprendizaje, haciendo que la información sea más atractiva y comprensible, especialmente para estudiantes con diferentes estilos de aprendizaje; **Colaboración y compartición:** Facilitan la colaboración entre estudiantes e investigadores al proporcionar herramientas para la discusión en línea, foros y espacios de trabajo compartidos. Esto fomenta un ambiente de aprendizaje colaborativo y la creación de redes entre

individuos interesados en áreas similares de investigación; **Sostenibilidad ambiental:** Al reducir la necesidad de imprimir material educativo en papel, los manuales en línea contribuyen a la sostenibilidad ambiental. Este enfoque digital no solo ahorra recursos naturales, sino que también facilita el acceso a la educación sin generar una huella ecológica significativa; **Adaptabilidad y personalización:** Los manuales en línea pueden adaptarse a las necesidades individuales de los estudiantes. A través de plataformas educativas en línea, los instructores pueden ofrecer contenido personalizado, evaluaciones específicas y retroalimentación inmediata, optimizando así el proceso de aprendizaje; **Promoción de la investigación:** Los manuales en línea no solo sirven como herramientas educativas, sino también como recursos para la investigación. Al proporcionar acceso a bibliotecas virtuales, bases de datos y materiales de referencia, estos manuales facilitan la investigación académica y la profundización en áreas específicas de conocimiento.

En resumen, los manuales didácticos en línea desempeñan un papel fundamental al proporcionar un acceso global a la educación y facilitar la investigación mediante la integración de tecnologías interactivas y la capacidad de actualización continua. Esta herramienta digital contribuye a un entorno educativo más dinámico, colaborativo y sostenible, promoviendo el aprendizaje a lo largo de toda la vida y el avance del conocimiento.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México. En este laboratorio, se dispone de 44 cepas microbianas, cada una de las cuales ha sido designada con una nomenclatura específica que comprende género, origen y número de cepa, con el propósito de establecer un orden.

Durante el proceso, se llevaron a cabo 11 pruebas bioquímicas en diversos medios de cultivo. Estas pruebas incluyeron la Tinción de Gram, Prueba de catalasa, Agar Énterico Hektoen, Eosina y azul de Metileno, Agar MacConkey con Sorbitol, Agar Escherichia coli, Agar Citrato de Simmons, Agar Triple Azúcar Hierro, Agar Salmonella y Shigella, Agar Xilosa Lisina Desoxicolato, Medio Base Oxford y Agar Verde Brillante. El objetivo era observar y registrar las reacciones específicas de las bacterias en cada uno de estos medios.

Los resultados de las pruebas se organizaron en un cuadro, donde las columnas representan el nombre de la prueba y las filas contienen el ID de la bacteria junto con su reacción correspondiente en cada prueba de identificación.

Adicionalmente, se crearon fichas técnicas para cada género de bacteria. Estas fichas contienen información detallada, como la forma, clasificación de Gram, capacidad de oxígeno, vía de transmisión, medio de cultivo adecuado para realizar pruebas de identificación bacteriana, reacción esperada y morfología colonial.

Finalmente, se elaboró un manual digital en el software Genially que integra toda la información recopilada. Este manual online no solo proporciona una presentación accesible, sino que también incorpora elementos interactivos para facilitar tanto la adquisición como la difusión de conocimientos.

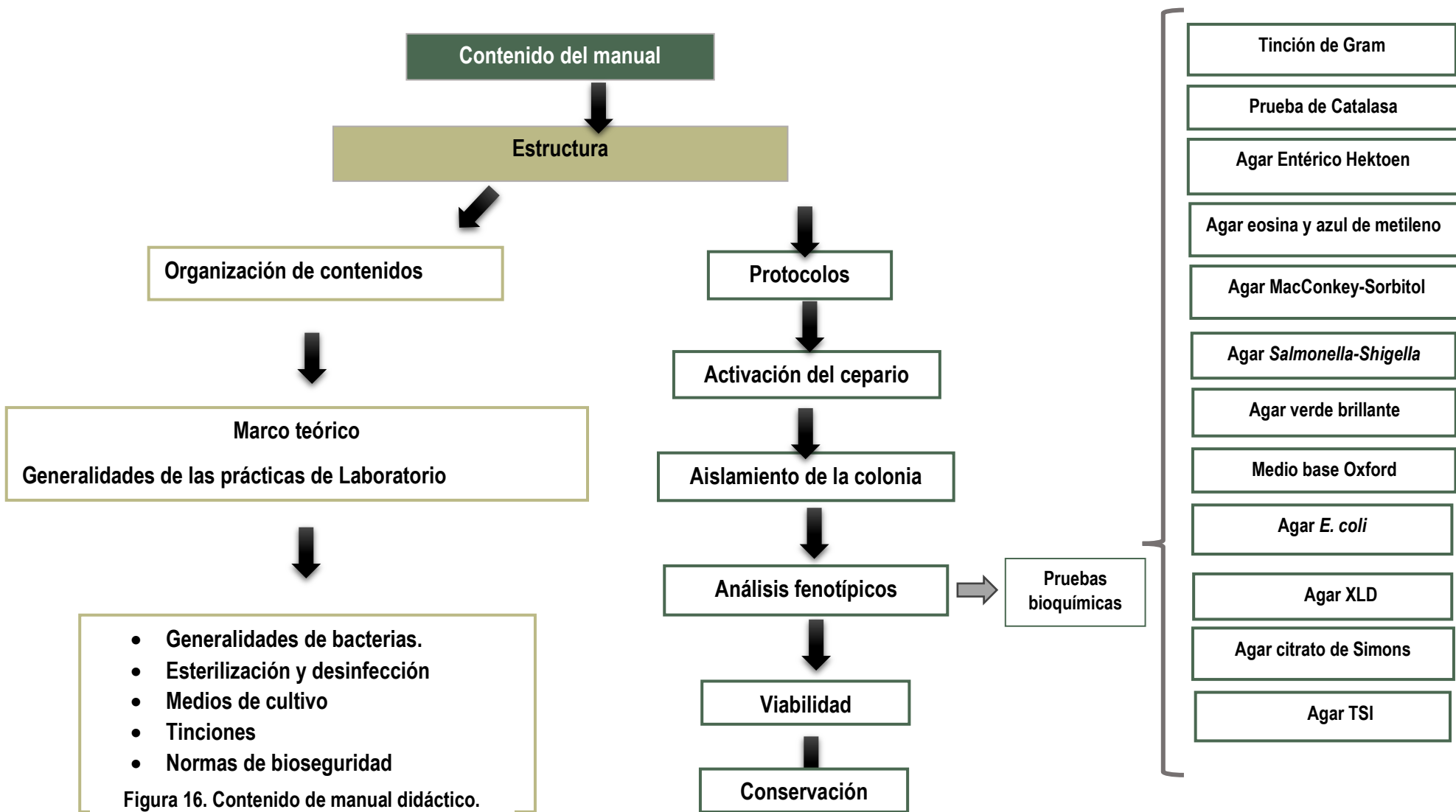


Figura 16. Contenido de manual didáctico.

6.1. Protocolos.

En el laboratorio, se requiere vestimenta adecuada (zapatos antiderrapantes, bata blanca, cubrebocas, cofia, sin joyería) y buena higiene. Es esencial sanitizar superficies, inspeccionar materiales y equipos para prevenir accidentes, revisar la disponibilidad de medios de cultivo y reactivos, y tener material de vidrio estéril a mano, asegurando así un ambiente seguro y eficiente. El cuadro 11. Nos muestra la clave para la creación de la nomenclatura de las bacterias.

Cuadro 11. Clave del cepario bacteriano del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria.

Sigla	Significado
E	Enterobacteriaceae
Lis	Listeriaceae
Pse	Pseudomonadaceae
H	Hospital.
L	Lechuga.
J	Jitomate.
Es	Espinaca.
D	Donación.
E.c	<i>Escherichia coli.</i>
S.t	<i>Salmonella typhimurium.</i>
S.e	<i>Salmonella enteritis.</i>
E.f	<i>Enterococcus faecalis.</i>
B.s	<i>Bacillus subtilis.</i>
L.i	<i>Listeria innocua.</i>
P.a	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>

Cuadro 12. Cepas bacterianas conservadas en el Laboratorio de Inocuidad Alimentaria.

Clave	Clasificación	Clave	Clasificación
EHE.c1	<i>Escherichia coli</i>	EJE.c23	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c2	<i>Escherichia coli</i>	EHE.c24	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c3	<i>Escherichia coli</i>	EEsE.c25	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c4	<i>Escherichia coli</i>	EHS.t26	<i>Salmonella typhimurium</i>
EHS.t5	<i>Salmonella typhimurium</i>	EJE.c27	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c6	<i>Escherichia coli</i>	EHE.c28	<i>Escherichia coli</i>
EHS.t7	<i>Salmonella typhimurium</i>	EHE.c29	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c8	<i>Escherichia coli</i>	EJE.c30	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c9	<i>Escherichia coli</i>	EHE.c31	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c10	<i>Escherichia coli</i>	EHE.c32	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c11	<i>Escherichia coli</i>	EHE.c33	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c12	<i>Escherichia coli</i>	EHE.c34	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c13	<i>Escherichia coli</i>	EHE.c35	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c14	<i>Escherichia coli</i>	EHE.c36	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c15	<i>Escherichia coli</i>	EHE.c37	<i>Escherichia coli</i>
EHE.c16	<i>Escherichia coli</i>	EHE.c38	<i>Escherichia coli</i>
ELE.c17	<i>Escherichia coli</i>	EHS.e39	<i>Salmonella enteritis</i>
EHS.t18	<i>Salmonella typhimurium</i>	EDE.f40	<i>Enterococcus faecalis</i>
EHE.c19	<i>Escherichia coli</i>	EDB.s41	<i>Bacillus subtilis</i>
EJE.c20	<i>Escherichia coli</i>	LisDL.i42	<i>Listeria innocua</i>
EJE.c21	<i>Escherichia coli</i>	PseDP.a43	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
EHE.c22	<i>Escherichia coli</i>	EDB.s44	<i>Bacillus subtilis</i>

6.2 Activación de cepas.

Se prepararon placas de Agar Luria Bertani, suspendiendo 25 gramos de medio en un Lde agua destilada, mezclar bien y disolver por calentamiento agitando con frecuencia. Hervir durante un minuto hasta la disolución completa y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar hasta 50°C aproximadamente y distribuir en cajas Petri. Se utilizó una caja de medio de cultivo por bacteria para activar la cepa, ya que por su alto valor nutritivo es considerado también un medio de recuperación de células. La siembra se realizó por la técnica de estría masiva, posteriormente se dejó incubar por a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 horas, transcurrido el tiempo se leyeron los resultados. Se consideró satisfactorio cuando se logró observar el desarrollo de las colonias figura 16; La prueba se rechaza cuando no se logró observar desarrollo de microorganismos, en estos casos se repitió el procedimiento mínimo 3 veces para lograr el cometido, si es el caso se verá desarrollo en alguno de los intentos. Si no se logra observar un desarrollo la bacteria ha muerto.



Figura 17. Agar Luria Bertani inoculado por la técnica de estría masiva.

6.3 Pureza: Aislamiento.

Se realizó un aislamiento de colonias, en el medio de Agar MacConkey donde se suspendieron 50 gramos del medio en 1 Lde agua purificada. Calentar con agitación suave hasta completa disolución

del polvo y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos y vaciar en cajas Petri. Se utilizó una caja de medio de cultivo por bacteria para activar la cepa. Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos, además todas las especies de la familia Enterobacteriaceae desarrollan en el mismo; posteriormente se dejó incubar por a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 horas, transcurrido el tiempo se leyeron los resultados. Las colonias aisladas se observan en forma de puntos, cuando ocurre una contaminación en la caja por más microorganismos diferentes al inoculado se procede a tomar una asada como muestra de cada microorganismo y se inoculo en una caja Petri de agar MacConkey independiente, con el propósito de obtener colonias aisladas.

6.3.1 Reserva

Una vez aisladas las colonias, se preparó una caja por bacteria de agar Luria Bertani, con el propósito de pasar las colonias puras a un medio de enriquecimiento y poder usarlas en las siguientes pruebas. Se inocularon por la técnica estría cruzada como en la figura 17, y se incubaron a 37°C por 24 horas, etiquetándose con los datos correspondientes y posteriormente fueron almacenadas en refrigeración.




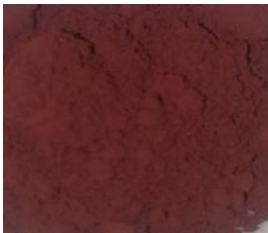


Figura 18. Agar Luria Bertani por estría cruzada.

6.3.2 Técnicas rápidas.

La primera prueba que se realizó a las bacterias fue la tinción de Gram, tomando la muestra que se encontraba sembrada en Agar Luria Bertani, se realizó Tinción de Gram a todas las bacterias para clasificarlas de acuerdo con su tipo de pared celular. Primero se prepararon los colorantes, en el cuadro 13 podremos ver las concentraciones de cada sustancia, en seguida se realizó el procedimiento de la Tinción de Gram como se observa en la figura 18.

Cuadro 13. Preparación de colorantes.

Colorante	Concentración	Reactivos
Cristal violeta	Para 500 ml -100ml de cristal violeta (solución saturada el alcohol), 400ml de oxalato amoniaco al 1% en agua. Reposar la solución de oxalato durante 24 horas, precalentada a 30°C y después mezclar con la solución de cristal violeta.	Cristal violeta 
Lugol	1 gramo de cristales de Yodo, mas 2 gramos de Yoduro de Potasio en 300ml de agua destilada	Yoduro de potasio  Yodo 
Safranina	En 50 mililitros de agua destilada, diluir 0.5 gramos de safranina	Safranina 
Alcohol cetona	Mezclar 80 mililitros de alcohol del 90° y 20 mililitros de acetona.	

Procedimiento para realizar la Tinción de Gram.

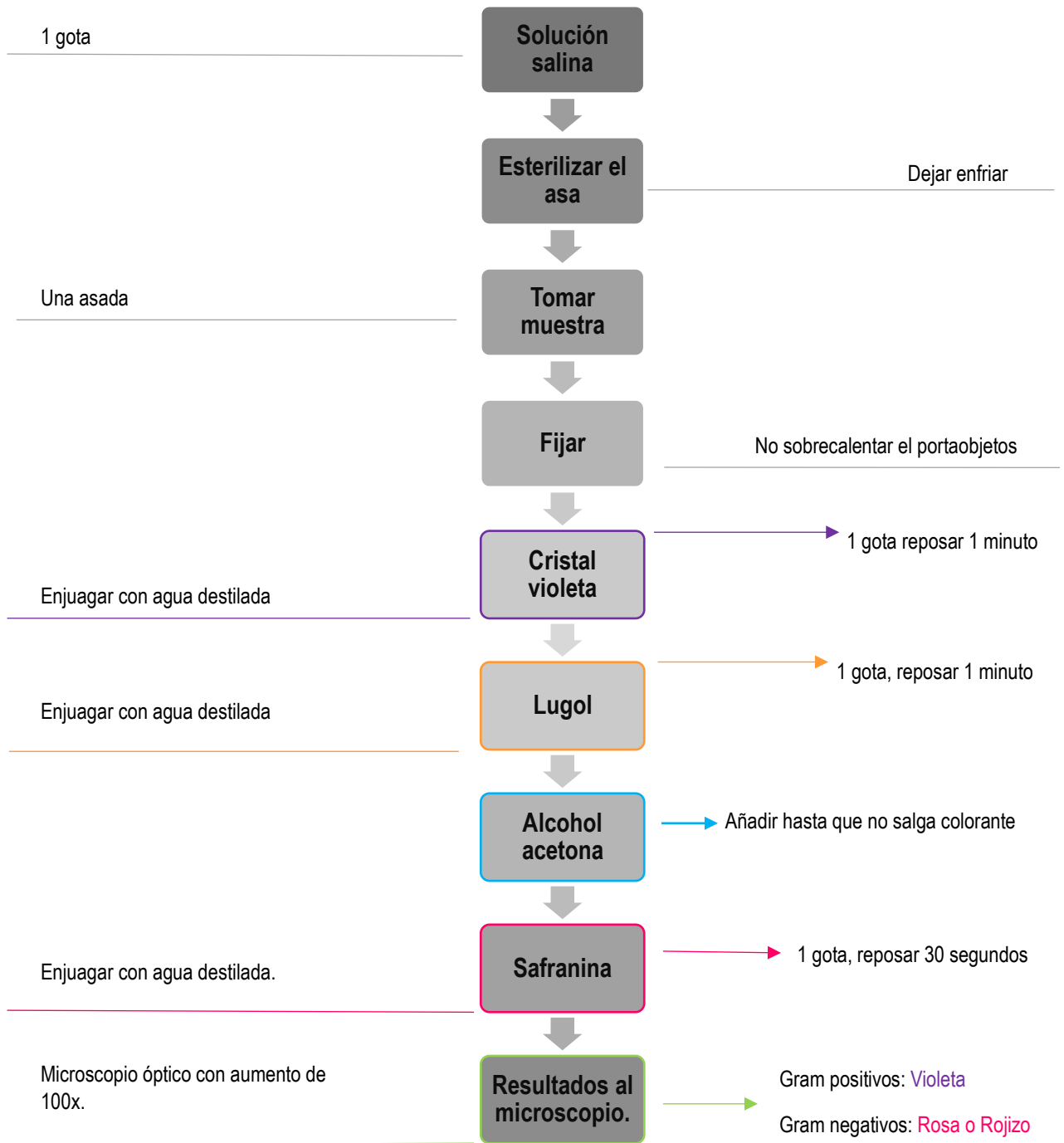


Figura 19. Procedimiento para realizar la Tinción de Gram siguiendo el método de Harvey RA, Champe PC.

Las muestras se observaron en el microscopio, empezando por el objetivo de menor aumento, hasta 100X. La pared celular de las bacterias Gram positivas logra la retención del primer colorante que es el azul de metileno. Por otro lado, las bacterias Gram negativas se tiñen con el segundo colorante (González *et al.*, 2020). Las bacterias Gram positivas se van a teñir de violeta y las bacterias Gram negativas de rosa o rojo como se observa en a figura 19.

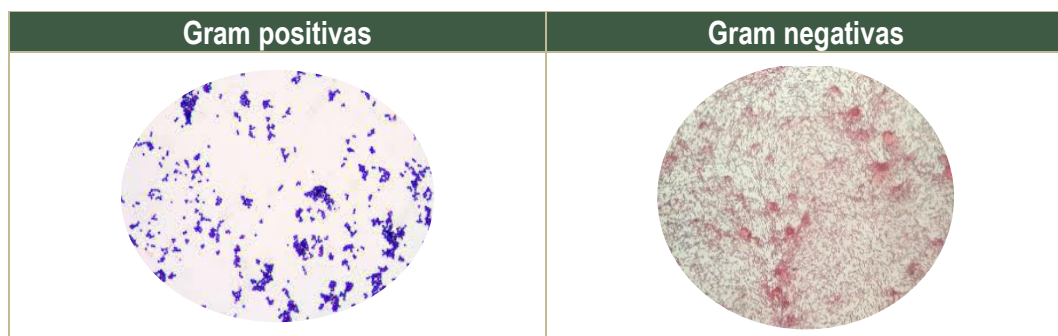
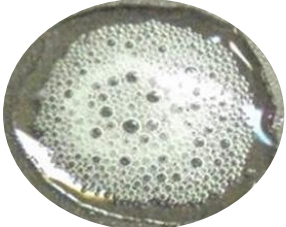
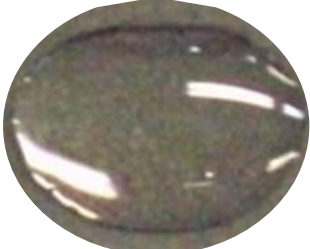


Figura 20. Resultados de la Tinción de Gram.

Se realizaron pruebas de catalasa, la cual es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias; se realizó la interpretación de resultados mediante la determinación de la presencia de gas en forma de burbujeo, basándonos en el cuadro 14.

Cuadro 14. Resultados de la prueba de catalasa.

Características del microorganismo	Medio	Ejemplo
Positiva: Presencia de enzima catalasa	Presencia de gas o burbujeo	
Negativa: Ausencia de la enzima catalasa	Ausencia de cambio	

6.4 Pruebas bioquímicas.

Se preparó una caja de agar luria Bertani por bacteria y se inoculó por la técnica de estría cruzada con el objetivo de confirmar la ausencia de contaminación y tener bacterias jóvenes. De esta caja se tomó una asada para realizar las de las pruebas bioquímicas.

6.4.1 Agar Entérico Hektoen.

Se prepararon placas de Agar Énterico Hektoen suspendiendo 76 gramos del polvo en 1 L de agua purificada, se mezcló y calentó hasta ebullición agitándola frecuentemente para disolver completamente el polvo, este medio no requiere la esterilización en autoclave, se dejó enfriar hasta que alcance la temperatura de 47 °C y se distribuyó en cajas Petri. Se utilizó una caja de medio de cultivo por bacteria inoculada, por de estría cruzada, este medio de cultivo es selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. Posteriormente se incubo a 35 ± 2 °C durante 22 ± 2 horas. Se logra una mejor diferenciación entre especies de *Salmonella* y *Shigella* al incubar las placas durante 48 horas. Finalmente se leyeron los resultados de acuerdo con el cuadro 15, se debe determinar la fermentación de lactosa y la producción de ácido sulfhídrico.

Cuadro 15. Resultados Agar Énterico Hektoen.

Características del microorganismo	Color del medio	Ejemplo
Microorganismos fermentadores de lactosa	Colonias amarillas o anaranjadas	
Microorganismos no fermentadores de lactosa	Colonias del color del medio, verde-azuladas	
Microorganismos productores de ácido sulfhídrico.	Colonias con centro negro.	

6.4.2 Agar de Eosina y Azul de metileno.

Se prepararon placas de Agar Eosina y Azul de Metileno suspendiendo 36 g del polvo en 1 L de agua destilada, se dejó reposar 5 minutos y se calienta con agitación frecuente hasta llevar a ebullición, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos, se distribuyó en cajas Petri, utilizando una caja

de medio de cultivo por bacteria inoculada por la técnica de estría cruzada. Este medio (también denominado E.A.M.) es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*, posteriormente se dejó incubar por a 35 ± 2 °C durante 48 ± 2 horas. Finalmente se leyeron los resultados de acuerdo con el cuadro 16.

Cuadro 16. Resultados en Agar Eosina y Azul de Metileno.

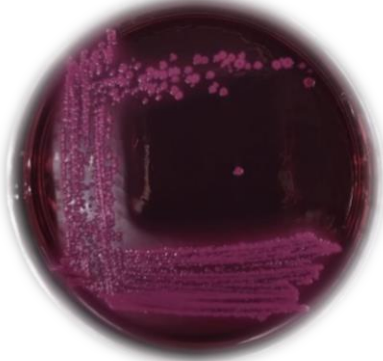
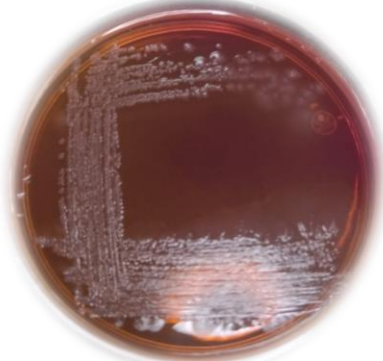
Características del medio	Color del medio	Ejemplo
Microorganismos fermentadores de lactosa y / o sacarosa	Colonias de color negro azulado o amarronado. Pueden tener centro oscuro y brillo metálico.	
Microorganismos fermentadores no de lactosa y sacarosa	Colonias del color del medio, incoloras.	

6.4.3 Agar MacConkey-Sorbitol.

Se prepararon placas de Agar MacConkey con Sorbitol suspendiendo 50 gramos del polvo en 1 L de agua destilada, se calentó con agitación frecuentemente y se hirvió durante 1 minuto para disolver completamente el polvo, fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos; Se dejó enfriar hasta 45-50 °C, posteriormente fue distribuido en cajas Petri; utilizándose una caja de medio de cultivo por bacteria inoculada por estría cruzada, este es un medio selectivo y diferencial utilizado para el

aislamiento de *Escherichia coli* O157 H7 a partir de heces, alimentos y otros materiales de importancia sanitaria. Posteriormente se dejó incubar por a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 horas. Finalmente se leyeron los resultados de acuerdo con el cuadro 16, con las características observables de las colonias.

Cuadro 17. Resultados en Agar MacConkey con Sorbitol.


Características del medio	Color del medio	Ejemplo
Microorganismos fermentadores de sorbitol	Colonias rosadas-rojizas. Puede observarse halo de precipitación biliar	
Microorganismos no fermentadores de sorbitol	Colonias del color del medio, incoloras.	

6.4.4 Agar Salmonella y Shigella.

Se prepararon placas de Agar Salmonella y Shigella suspendiendo 60 g del polvo en 1 L de agua destilada, se dejó reposar durante 5 minutos y se mezcló hasta homogeneizar; calentándose con agitación frecuente llevándose a ebullición durante 1 minuto para su disolución total; este medio no necesita esterilización en autoclave. Se dejó enfriar y fue distribuido en placas de Petri estériles, utilizándose una caja de medio de cultivo por bacteria inoculada por la técnica de estría masiva, este es un medio de cultivo selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de *Salmonella* spp. y de algunas especies de *Shigella* spp. a partir de heces, alimentos y otros materiales en los cuales se

sospeche su presencia. Posteriormente se dejó incubar por a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 horas. Finalmente se leyeron los resultados de acuerdo con el cuadro 18.

Cuadro 18. Resultados en Agar Salmonella y Shigella.

Características del medio	Color del medio	Ejemplo
Microorganismos fermentadores de lactosa	Colonias rosadas o rojizas.	
Microorganismos fermentadores de lactosa no	Colonias del color del medio, incoloras.	
Microorganismos productores de SH₂	Colonias con centro negro.	




6.4.5 Agar Triple azúcar hierro o TSI.

Se prepararon tubos de Agar Triple Azúcar Hierro suspendiendo 62.5 g del polvo en 1 L de agua destilada, se dejó reposar 5 minutos y posteriormente se calentó con agitación frecuente dejándose hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total, fue distribuido en tubos, llenándolos con un volumen que ocupe hasta la tercera parte de estos, se esterizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos, transcurrido el tiempo se dejaron enfriar y solidificar el agar en pico de flauta profundo, utilizándose un tubo de medio de cultivo por bacteria inoculada, con una aguja de inoculación picar el fondo y

extender en forma de estría sobre la superficie. Este es un medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de los hidratos de carbono glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico. Posteriormente se dejó incubar por a 35 ± 2 °C durante 24 ± 2 horas. Finalmente se leyeron los resultados observando el color del medio de cultivo y la producción de gas como se muestra en el cuadro 19.

Cuadro 19. Resultados en Agar Triple Azúcar Hierro.

Características del medio	Color del medio	Ejemplo
<p>El microorganismo solamente fermenta la glucosa.</p>	<p>Superficie alcalina/Profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo)</p>	
<p>El microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.</p>	<p>Superficie ácida/Profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo)</p>	

<p>El microorganismo es no fermentador de azúcares.</p>	<p>Superficie alcalina/Profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo)</p>	
<p>La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo</p>	<p>Indican que el microorganismo produce gas.</p>	
<p>Ennegrecimiento</p>	<p>Producción de ácido sulfhídrico.</p>	

6.4.6 Agar Verde Brillante.

Se prepararon placas de Agar Salmonella y Shigella suspendiendo 58 g del polvo en 1 L de agua destilada, teniendo 5 minutos de reposo, se calentó con agitación frecuente y se llevó a ebullición para disolución total; esterilizándose en autoclave a 120°C durante 15 minutos, transcurrido el tiempo se dejó enfriar para su posterior vaceado en placas de Petri estériles, utilizándose una caja de medio

de cultivo por bacteria inoculada por la técnica de estría masiva, este es un medio de enriquecimiento altamente selectivo para el aislamiento de *Salmonella* spp., excepto *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* a partir de muestras clínicas, alimentos, y otros materiales de importancia sanitaria. Posteriormente se dejó incubar por a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 horas. Finalmente se leyeron los resultados de acuerdo con el cuadro 20.

Cuadro 20. Resultado en Agar Verde Brillante.


Características del medio	Color del medio	Ejemplo
Bacterias que fermentan la lactosa y/o sacarosa	Colonias amarillo-verdosas, rodeadas por un halo de color amarillo verdoso del medio de cultivo.	
Bacterias que no fermentan la lactosa y/o sacarosa	Colonias de color blanco rosadas o transparentes rodeadas por un halo rojizo del medio de cultivo	

6.4.7 Medio Base Oxford.

Se prepararon placas de Agar Medio Base Oxford suspendiendo 26.3 g del polvo en 500 ml de agua destilada, con un reposo de 5 minutos; se mezcló y calentó con agitación frecuente hasta llegar a ebullición para disolución total, esterilizándose en autoclave a 121°C durante 15 minutos,

posteriormente se distribuyó en cajas Petri, se utilizó una caja de medio de cultivo por bacteria inoculada por estría cruzada. Este es un medio de cultivo que con el agregado de antimicrobianos permite el aislamiento selectivo de *Listeria* spp, permitiendo el desarrollo de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Posteriormente se dejó incubar por a 35 ± 2 °C durante 48 ± 2 horas. Finalmente se leyeron los resultados de acuerdo a las características observables como se observa en el cuadro 21.

Cuadro 21. Resultados en Medio Base Oxford.

Características del microorganismo	Color del medio	Ejemplo
Positivo: Formación de compuestos fenólicos	Colonias lisas verdosas, con halo negro sobre fondo claro	
Negativo: Inhibición de crecimiento bacteriano	Color del medio	

6.4.8 Agar Citrato de Simons.

Se prepararon tubos de Agar Citrato de Simmons suspendiendo 24.2 g del polvo en 1 L de agua destilada, con un reposo de 5 minutos, se calentó con agitación frecuente hasta ebullición durante 1 o 2 minutos para disolución total; vaciándose en tubos de ensaye para su esterilización por autoclave a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente se dejaron enfriar hasta solidificar el agar en pico de

flauta profundo, utilizándose un tubo de medio de cultivo por bacteria, con una aguja de inoculación picar el fondo y extender en forma de estría sobre la superficie. Este es un medio utilizado para la diferenciación de enterobacterias en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía. Posteriormente se dejó incubar por a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 horas. Finalmente se leyeron los resultados observando el color del medio de cultivo como lo indica el cuadro 22.

Cuadro 22. Resultados en Agar Citrato de Simmons.

Características del microorganismo	Color del medio	Ejemplo
<p>Positivo: Producción de citrato permeasa.</p>	<p>Crecimiento bacteriano con un intenso color azul en el pico de flauta.</p>	
<p>Negativo: Ausencia de producción de citrato permeasa.</p>	<p>Ausencia de crecimiento y permanencia del color verde del medio de cultivo.</p>	

6.4.9 Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD).

Se prepararon tubos de Agar Xilosa Lisina Desoxicolato suspendiendo 55 g en 1 L de agua destilada, calentándose con agitación frecuentemente hasta su disolución, posteriormente fue vaciado a tubos de ensaye, este medio de cultivo no necesita esterilización por autoclave, se dejó enfriar y solidificar

el agar en pico de flauta profundo, utilizándose un tubo de medio de cultivo por bacteria inoculada con una aguja de inoculación picar el fondo y extender en forma de estría sobre la superficie. Este es un medio moderadamente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y la diferenciación de patógenos entéricos gram negativos (*Salmonella* y *Shigella*) a partir de muestras clínicas. Es adecuado en especial para el aislamiento de la especie *Shigella*. Posteriormente se incubó por a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 25 ± 2 horas. Finalmente se leyeron los resultados observando las colonias típicas de salmonella tienen un centro negro y un ligero zona transparente de color rojizo debido al cambio de color del indicador. Variantes negativas de salmonella H₂S son de color rosa con un tono más oscuro y centro rosa, salmonella lactosa positiva son de color amarillo con o sin ennegrecimiento el color del medio de cultivo como se muestra en el cuadro 23.

Cuadro 23. Resultados en Agar Xilosa Lisina Desoxicolato.

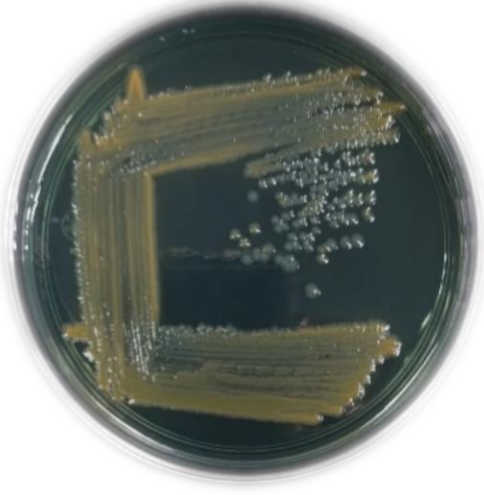
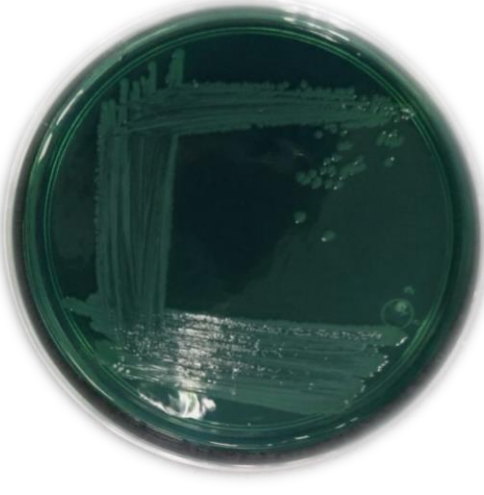
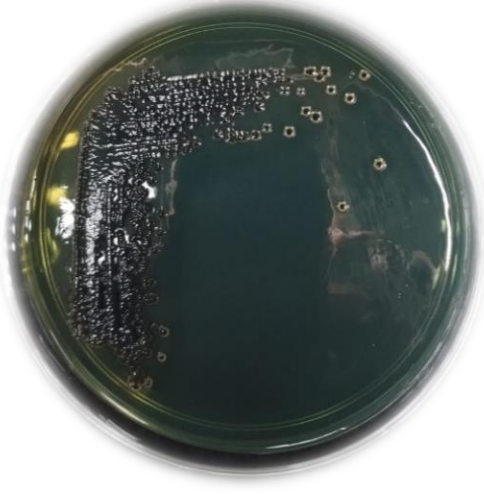
Características del microorganismo	Color del medio	Ejemplo
Colonias rojas con centro negro	Positivo	

<p>Colonias amarillas</p>	<p>Negativo</p>	
<p>Colonias ennegrecidas</p>	<p>Productoras de ácido sulfhídrico</p>	

6.4.10 Agar Escherichia coli.

Se prepararon placas de Agar Escherichia coli suspendiendo 26.45 gramos del medio en un L de agua destilada, se mezcló bien y se calentó con agitación suave hasta su completa disolución, hirviéndose durante un minuto, este medio no necesita esterilización por autoclave, su vaciado se realizó en cajas Petri, utilizándose una caja de medio de cultivo por bacteria inoculada por la técnica de estría cruzada. Este medio de cultivo es selectivo para aislamiento y diferenciación de cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* O157: H7 a partir de diversas muestras. Posteriormente se dejó incubar por a 35 ± 2 °C durante 48 ± 2 horas. Finalmente se leyeron los resultados de acuerdo con el cuadro 24.

Cuadro 24. Resultados en Agar Escherichia coli.

Características del microorganismo	Color del medio	Ejemplo
Positiva	Colonias amarillas	
Negativa: Bacterias Gram negativas	Colonias incoloras o del color del medio	
Formadoras de ácido sulfhídrico:	Ennegrecimiento.	

6.5 Viabilidad.

Para nuestro cepario se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) por diluciones seriadas a partir de la muestra madre, hasta $n * X10^6$ en tubos con 9 mililitros de peptona de caseína. Cada dilución se sembró por triplicado. Se consideró satisfactoria una concentración celular igual o superior a 10^5 UFC/mL. Se prepararon 6 tubos por bacteria.

Se ordeno en una rejilla primero el tubo con caldo luria, seguido 5 tubos con peptona de caseína como en la figura 20.

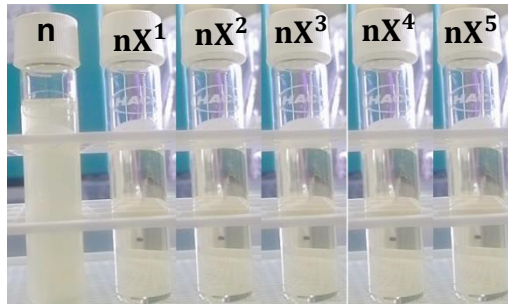


Figura 21. Ordenamiento de tubos para diluciones.

Se tomó con una micropipeta 1 ml de muestra y se transfirió al primer tubo con peptona de caseína, así hasta llegar al tubo número 5. Esto con cada una de las bacterias como en la figura 21.



Figura 22. Diluciones seriadas de tubos de peptona de caseína.

6.5.1 Conteo de colonias

Se preparo una caja Petri por bacteria de agar MacConkey, del tubo nX^5 se tomaron 10 μL de solución y se depositó la gota en el medio de cultivo colocando 6 gotas cada una con 10 μL , como en la figura 22, se llevaron a incubaron a 37 ° por 24 horas, transcurrido el tiempo contar las colonias en cada gota y realizar un promedio para obtener las UFC/ml.

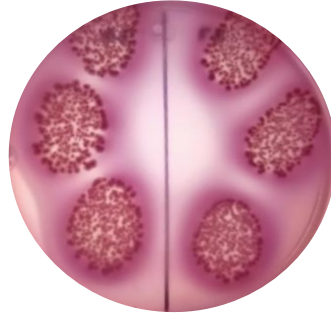


Figura 23. Caja Petri de Agar MacConkey inoculado con la técnica de gota en placa.

6.6 Conservación.

Como primer paso se esteriliza el material y reactivos (glicerol), se preparó caldo Luria Bertani y se le agrego 20% de glicerol estéril posteriormente se acomodaron los tubos Eppendorf de 5 mililitros de volumen abiertos y con una micropipeta se tomó 3 microlitros del medio y se transfirieron a los tubos, se tomó una asada de muestra y se transfirió a un tubo, preparándose 6 copias por bacteria, cada muestra se etiqueto con la fecha, nombre de quién inoculó, y el ID de la bacteria, llevándose a incubar a 37° por 24 horas y posteriormente se llevaron a congelación por tres meses.

6.6.1 Establecimiento del cepario

Teniendo en cuenta que los tubos de Eppendorf están etiquetados se almacenaron en un refrigerador marca Mabe a una temperatura de -3°C, dentro de una caja de Unicel para evitar contaminaciones, el glicerol se agrego como agente de crioprotección por lo que su transferencia periódica será cada 3 meses.

VII. VII. RESULTADOS.

7.1 Resultados de las pruebas.

El cuadro 25 nos muestra los resultados obtenidos a partir del análisis de las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias que conforman el cepario del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria de la Facultad de Ciencias Agrícolas. Se da por hecho que todas estas bacterias resultaron ser viables, estables, y puras.

Cuadro 25. Resultados de pruebas rápidas y bioquímicas realizadas a las bacterias que conforman el cepario del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria.

Clave	Clasificación	Prueba de catalasa		Tinción de Gram		Agar enterico Hektoen		Eosina y azul de metileno		Agar MacConkey-Sorbitol		Escherichia coli		Agar citrato de Simons		Agar Triple azúcar hierro			Agar Samonella y Shigella			Agar Xilosa lisina desoxicolato		Medio base Oxford		Agar verde Brillante	
		Fermentador de Lactosa	Producción de ácido sulfhídrico	Fermentadores de lactosa y/o sacarosa	No fermentadoras de lactosa y sacarosa	Fermentadores de sorbitol	No fermentadores de sorbitol	Positiva	Producción de ácido sulfhídrico	Positiva	Negativa	Superficie / profundidad	Producción de gas	Producción de ácido sulfhídrico	Fermentador de lactosa	No fermentador de lactosa	Producción de ácido sulfhídrico	Positiva	Negativa	Producción de ácido sulfhídrico	Positivo	Negativo	Fermentador de lactosa y/o sacarosa	No fermentador de lactosa y/o sacarosa			
EHE.c1	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-	
EHE.c2	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-	

Clave	Clasificación	Prueba de catalasa	Tinción de Gram	Agar enterico Hektoen		Eosina y azul de metileno		Agar MacConkey-Sorbitol		Escherichia coli		Agar citrato de Simons		Agar Triple azúcar hierro			Agar Samonella y Shigella			Agar Xilosa lisina desoxicolato			Medio base Oxford		Agar verde Brillante	
				Fermentador de Lactosa	Producción de ácido sulfhídrico	Fermentadores de lactosa y/o sacarosa	No fermentadoras de lactosa y sacarosa	Fermentadores de sorbitol	No fermentadores de sorbitol	Positiva	Producción de ácido sulfhídrico	Positiva	Negativa	Superficie / profundidad	Producción de gas	Producción de ácido sulfhídrico	Fermentador de lactosa	No fermentador de lactosa	Producción de ácido sulfhídrico	Positiva	Negativa	Producción de ácido sulfhídrico	Positivo	Negativo	Fermentador de lactosa y/o sacarosa	No fermentador de lactosa y/o sacarosa
EHE.c3	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c4	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHS.t5	<i>Salmonella typhimurium</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	K/A	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
EHE.c6	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHS.t7	<i>Salmonella typhimurium</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	K/A	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
EHE.c8	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c9	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c10	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c11	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c12	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-

/: Inhibido, A: reacción ácida (amarillo), K: reacción alcalina (rojo).

Clave	Clasificación	Prueba de catalasa		Tinción de Gram		Agar enterico Hektoen		Eosina y azul de metileno		Agar MacConkey-Sorbitol		Escherichia coli		Agar citrato de Simons		Agar Triple azúcar hierro		Agar Samonella y Shigella			Agar Xilosa lisina desoxicolato			Medio base Oxford		Agar verde Brillante	
		Fermentador de Lactosa	Producción de ácido sulfhídrico	Fermentadores de lactosa y/o sacarosa	No fermentadoras de lactosa y sacarosa	Fermentadores de sorbitol	No fermentadores de sorbitol	Positiva	Producción de ácido sulfhídrico	Positiva	Negativa	Superficie / profundidad	Producción de gas	Producción de ácido sulfhídrico	Fermentador de lactosa	No fermentador de lactosa	Producción de ácido sulfhídrico	Positiva	Negativa	Producción de ácido sulfhídrico	Positivo	Negativo	Fermentador de lactosa y/o sacarosa	No fermentador de lactosa y/o sacarosa			
EHE.c13	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-	
EHE.c14	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c15	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c16	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
ELE.c17	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHS.t18	<i>Salmonella typhimurium</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	K/A	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
EHE.c19	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EJE.c20	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EJE.c21	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c22	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-

/: Inhibido, A: reacción ácida (amarillo), K: reacción alcalina (rojo).

Clave	Clasificación	Prueba de catalasa	Tinción de Gram	Agar enterico Hektoen		Eosina y azul de metileno		Agar MacConkey-Sorbitol		Escherichia coli		Agar citrato de Simons		Agar Triple azúcar hierro			Agar Samonella y Shigella			Agar Xilosa lisina desoxicolato			Medio base Oxford		Agar verde Brillante	
				Fermentador de Lactosa	Producción de ácido sulfhídrico	Fermentadores de lactosa y/o sacarosa	No fermentadoras de lactosa y sacarosa	Fermentadores de sorbitol	No fermentadores de sorbitol	Positiva	Producción de ácido sulfhídrico	Positiva	Negativa	Superficie / profundidad	Producción de gas	Producción de ácido sulfhídrico	Fermentador de lactosa	No fermentador de lactosa	Producción de ácido sulfhídrico	Positiva	Negativa	Producción de ácido sulfhídrico	Positivo	Negativo	Fermentador de lactosa y/o sacarosa	No fermentador de lactosa y/o sacarosa
EJE.c23	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c24	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EEsE.c25	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHS.t26	<i>Salmonella typhimurium</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	K/A	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
EJE.c27	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c28	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c29	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EJE.c30	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c31	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c32	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-

/: Inhibido, A: reacción ácida (amarillo), K: reacción alcalina (rojo).

Clave	Clasificación	Prueba de catalasa	Tinción de Gram	Agar enterico Hektoen		Eosina y azul de metileno		Agar MacConkey-Sorbitol		Escherichia coli		Agar citrato de Simons		Agar Triple azúcar hierro			Agar Samonella y Shigella			Agar Xilosa lisina desoxicolato			Medio base Oxford		Agar verde Brillante	
				Fermentador de Lactosa	Producción de ácido sulfhídrico	Fermentadores de lactosa y/o sacarosa	No fermentadores de lactosa y sacarosa	Fermentadores de sorbitol	No fermentadores de sorbitol	Positiva	Producción de ácido sulfhídrico	Positiva	Negativa	Superficie / profundidad	Producción de gas	Producción de ácido sulfhídrico	Fermentador de lactosa	No fermentador de lactosa	Producción de ácido sulfhídrico	Positiva	Negativa	Producción de ácido sulfhídrico	Positivo	Negativo	Fermentador de lactosa y/o sacarosa	No fermentador de lactosa y/o sacarosa
EHE.c33	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	+	-	/	/	+	-	
EHE.c34	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c35	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c36	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c37	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHE.c38	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	+	-
EHS.e39	<i>Salmonella typhimurium</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	K/A	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
EDE.fc40	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	/	/	-	+	/	/	-	-	+	A/A	-	-	-	+	-	-	-	+	-	/	/	-	+
EDB.s41	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	A/A	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
LisDL.i42	<i>Listeria</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	A/A	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-

/: Inhibido, A: reacción ácida (amarillo), K: reacción alcalina (rojo).

Clave	Clasificación	Prueba de catalasa		Tinción de Gram		Agar enterico Hektoen		Eosina y azul de metileno		Agar MacConkey-Sorbitol		Escherichia coli		Agar citrato de Simons		Agar Triple azúcar hierro			Agar Samonella y Shigella			Agar Xilosa lisina desoxicolato		Medio base Oxford		Agar verde Brillante		
		+	-	+	-	Fermentador de Lactosa	Producción de ácido sulfhídrico	Fermentadores de lactosa y/o sacarosa	No fermentadoras de lactosa y sacarosa	Fermentadores de sorbitol	No fermentadores de sorbitol	Positiva	Producción de ácido sulfhídrico	Positiva	Negativa	Superficie / profundidad	Producción de gas	Producción de ácido sulfhídrico	Fermentador de lactosa	No fermentador de lactosa	Producción de ácido sulfhídrico	Positiva	Negativa	Producción de ácido sulfhídrico	Positivo	Negativo	Fermentador de lactosa y/o sacarosa	No fermentador de lactosa y/o sacarosa
PseDP.a43	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	K/K	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
EDB.s44	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	A/A	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-

/: Inhibido, A: reacción ácida (amarillo), K: reacción alcalina (rojo).

7.2 Contenido del Manual didáctico.

Podrás tener acceso a este manual utilizando internet en la siguiente liga:

<https://view.genial.ly/650c95710be06300118c42a2/presentation-copia-manual-de-pruebas-bioquimicas>

el manual nos servirá como guía para indagar en el mundo de las bacterias. Primeramente, damos una introducción a las bacterias con los títulos de:

- **Generalidades de las bacterias:** Aquí tendrás información sobre la definición de bacteria, clasificación de las bacterias de acuerdo a su forma, pH, temperatura, necesidades de oxígeno y requerimientos nutricionales, una breve explicación de la estructura interna y externa de las bacterias y finalmente la forma de reproducción de estos microorganismos.
- **Esterilización y desinfección:** Podrás diferenciar los términos de limpieza, desinfección, esterilización y aplicaciones en el laboratorio. Esto es de suma importancia ya que al trabajar en el laboratorio con microorganismos debemos aplicar estas técnicas para evitar contaminaciones.
- **Medios de cultivo:** Contiene información sobre su definición, composición, la manera en cómo se clasifican los medios de cultivo, la preparación en tubo o caja Petri, las etapas en las que se debe realizar un control de calidad y por ultimo las diferentes técnicas de inoculación ya sea en tubo o caja Petri.
- **Tinciones:** Se da la definición de colorantes, así como una introducción a las acciones que ejercen sobre las bacterias, su clasificación y el proceso general de las tinciones.
- **Normatividad.** Breve introducción al Manual de Bioseguridad en el laboratorio de la OMS y la Norma ISO 9001.

La segunda parte del manual se conforma por los protocolos a desarrollar para a identificación de microorganismos. En primer lugar, la activación del cepario donde se describen los pasos para reactivar una cepa como segundo paso el aislamiento colonial, que consiste en separar las colonias para verificar que sea un cultivo puro. Seguidos de una Tinción de Gram la cual nos ayudara a clasificar a las bacterias en dos grandes grupos (bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas) de acuerdo con su tipo de pared celular. Posteriormente se realizaron 11 pruebas bioquímicas (Prueba de catalasa, Agar Énterico Hektoen, Agar Eosina y Azul de metileno, Agar MacConkey con Sorbitol, Agar Salmonella y Shigella, Agar Verde Brillante, Medio Base Oxford, Agar Escherichia coli, Agar Xilosa Lisina Desoxicolato, Agar Citrato de Simmons y Agar Triple azúcar). Es importante tomar en cuenta la viabilidad de las bacterias del cepario la cual fue realizada por medio de diluciones seriadas para la identificación bacteriana. Es importante realizar la conservación del cepario, dicha conservación es por un método físico de temperatura a -3°C.

7.2.1 Diseño del manual.

En la primera página podremos observaremos la portada con los datos de la unidad académica, así como los datos de la autora como se muestra en la figura 24.



Figura 24. Portada del manual digital.

El manual contiene hipervínculos en todos los títulos, sabrás su ubicación en la parte superior derecha se encuentra este icono, figura 25.



Figura 25. Icono de interacciones.

Al acercar el cursor a este icono, aparece la leyenda “Mostrar elementos interactivos”. En el cual al darle click en cualquiera de ellos automáticamente aparecerán más iconos iguales en diferentes partes de la pantalla; esto significa que en donde aparezcan estos iconos hay algún hipervínculo con información, puedes dar click en alguno y automáticamente te dirigirá al contenido, como se muestra en la figura 26.



Figura 26. Vista previa del icono de interacciones.

El cursor presentará una animación de zoom y podrá dar click para que nos redirija a una página con la información general del título como se muestra en el ejemplo al título de la figura 27.



Figura 27. Vista previa de un acercamiento al contenido.

Veamos un ejemplo el primer contenido está titulado “Generalidades de las bacterias”, cuando uste acerqué el cursor este título presentará una interacción de zoom, podrá dar click en el título que deseé conocer su contenido. Figura 28.

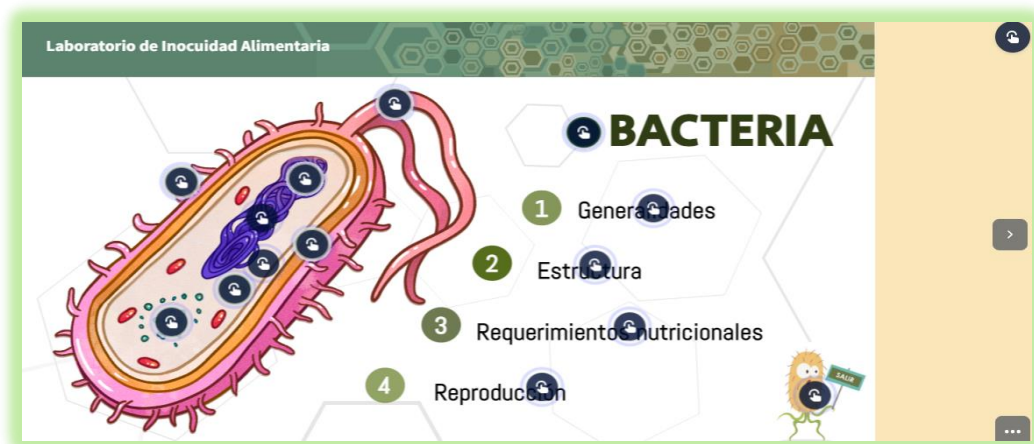


Figura 28. Ejemplo del contenido del manual digital.

En la parte inferior de cada página se encuentra este icono. Figura 29. En forma de bacteria amarilla con un letrero que dice “Salir”, cuando acercas el cursor realiza una animación de palpito y si le das click te lleva en automático al diagrama del “Contenido del manual”.

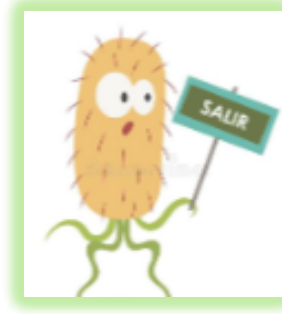


Figura 29. Icono de salida.

Icono inferior es la palabra “regresar “. Figura 30. Significa que aún hay información en la página anterior que no se ha revisado.



Figura 30. Icono regresar.

Icono que aparece en la parte inferior es la palabra “anterior “. Figura 31. Significa que tendrás que regresarte a la página anterior para terminar de visualizar la información.



Figura 31. Icono anterior.

Los títulos de:

- Activación de cepario.
- Aislamiento colonial.
- Pruebas bioquímicas.

Tienen en común los siguientes subtítulos:

1.- Elección del medio: Al darle click nos abre una ventana con el nombre del medio de cultivo, así como una pequeña presentación del mismo y una imagen con la presentación del envase del medio de cultivo.

2.- Composición: Al dar click nos abre una ventada con un cuadro de la composición y dosificación del medio de cultivo en cuestión.

3.- Fundamento: Al dar click nos abre una ventana con el fundamento de las reacciones que tienen los componentes del medio de cultivo en las bacterias inoculadas.

4.- Preparación: Al dar click nos abre una ventana con el modo de preparación del medio de cultivo, es de suma importancia este apartado ya que los medios de cultivo tienen diferentes formas de prepararse por ejemplo algunos se llevan a esterilizar en autoclave, mientras algunos solo se necesitan calentar en una parrilla de agitación.

5.- Características del medio: Al dar click nos abre una ventana con dos imágenes, una nos representa el medio de cultivo deshidratado (directo del envase) y la otra nos representa el medio de cultivo una vez rehidratado o preparado en estado puro. Este apartado nos ayudará a guiarnos sobre el color y uniformidad que debería resultarte el medio correctamente preparado.

6. Inoculación: Al dar click nos abre una ventana con una imagen que te servirá como guía para la técnica de inoculación en la caja Petri o tubo en el medio de cultivo. A un costado esta un texto que te dice que otras técnicas de inoculación puedes realizar.

7. Incubación: Al dar click nos abre una ventana con las condiciones (temperatura y tiempo) en las que debes incubar el medio de cultivo, para obtener colonias bien desarrolladas, este apartado es importante ya que cada bacteria requiere de un tiempo y temperatura distinto, algunas necesitan 24 horas y algunas otras necesitan hasta 72 horas para su óptimo desarrollo. Debajo verás una imagen de la incubadora que utilizamos en el laboratorio.

8. Lectura de resultados: Al dar click nos redirigirá a otro apartado con los posibles resultados que vas a obtener en el medio de cultivo, si acercas el cursor la imagen en automático tendrá una animación de zoom y a la vez aparecerá una etiqueta con los títulos de "Características del microorganismo" y debajo otro título con "Color del medio". Este es el primer paso para la identificación de microorganismos ya que cada bacteria reaccionará con los componentes del medio de cultivo de diferente manera. Figura 32 con un ejemplo del medio Triple Azúcar Hierro.



Figura 32. Ejemplo del diseño en el apartado de "resultados".

9. Finalmente tenemos el control de calidad: Al dar click nos abre una ventana con un cuadro que contiene un listado de microorganismos de referencia, el tipo de crecimiento (en algunos) y las características de las colonias (vistas en el apartado anterior titulado lectura de resultados), con esto concluimos la identificación de las bacterias ya que reconoceremos el género y en algunos casos también la especie de la bacteria que inoculamos. Figura 33.

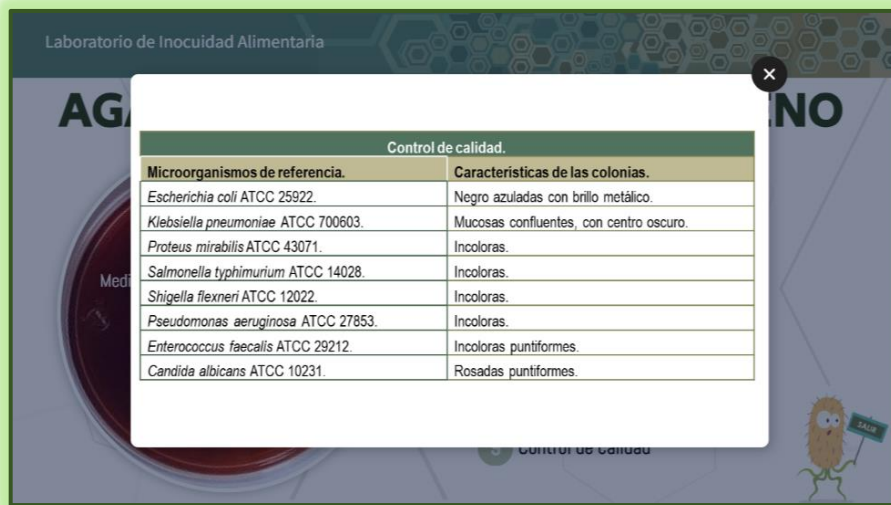


Figura 33. Ejemplo de la ventana "Control de calidad".

Finalmente tenemos esta página, con un pequeño agradecimiento. Figura 34.

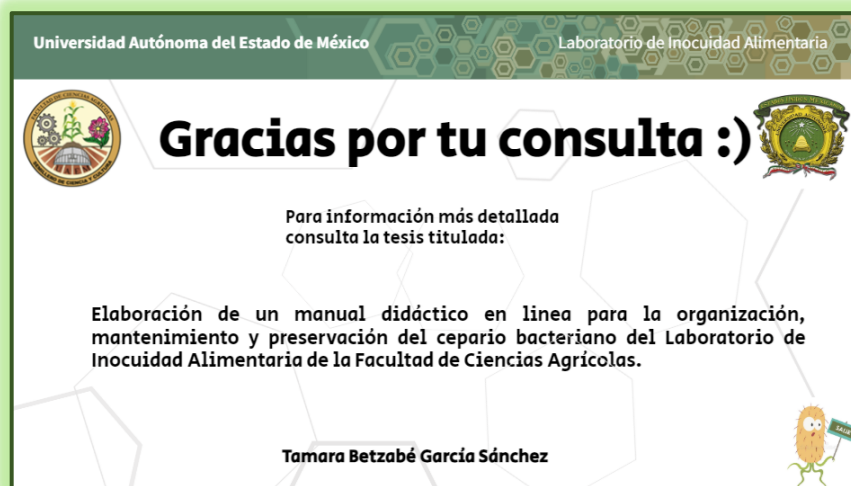


Figura 34. Final de la presentación.

7.3 Fichas técnicas de las bacterias del cepario.

Las tarjetas servirán como referencias de consulta rápida.

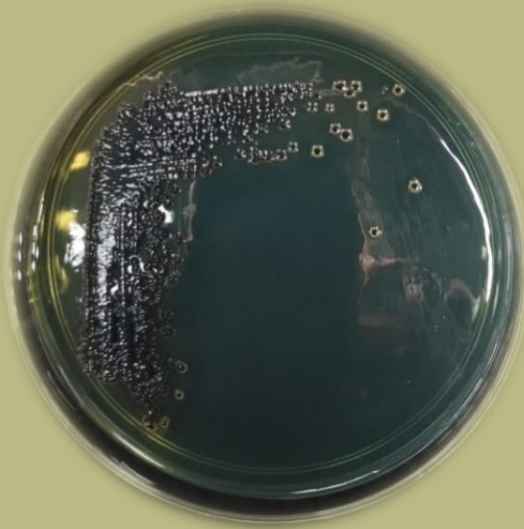
Escherichia coli

Familia: Enterobacteriaceae

Bacterias del cepario que son E. coli	EHE.c1- EHE.c2- EHE.c3- EHE.c4- EHE.c6- EHE.c8- EHE.c9- EHE.c10- EHE.c11- EHE.c12- EHE.c13- EHE.c14- EHE.c15- EHE.c16- EHE.c17- EHE.c19- EJE.c20- EJE.c21- EHE.c22- EJE.c23- EHE.c24- EEsE.c25- EJE.c27- EHE.c28- EHE.c29- EJE.c30- EHE.c31- EHE.c32- EHE.c33- EHE.c34- EHE.c35- EHE.c36- EHE.c37- EHE.c38.
Forma	Bacilos
Tinción	Gram negativo
Capacidad de oxígeno	Anaerobias facultativas
vía de transmisión	<ul style="list-style-type: none"> ♥ Inoculación ♥ Inhalación ♥ Forma exógena ♥ Ingestión
Medio de cultivo	Placa de Agar MacConkey y Agar Eosina y azul de metileno, Agar Entérico Hektoen, TSI, Verde Brillante, Citrato de Simons, XLD, Agar E. Coli
Método de Identificación	<ul style="list-style-type: none"> ♥ Oxidasa negativa ♥ Catalasa positiva ♥ Lisina descarboxilasa positiva ♥ Fermentador de lactosa positiva ♥ Citrato de Simons negativa ♥ TSI superficie y profundidad amarillo ♥ Producción de gas positivo ♥ Producción de ácido sulfhídrico negativo ♥ Inhibición de crecimiento en Agar Base Oxford
Morfología colonial 	<ul style="list-style-type: none"> ♥ Colonias circulares de tamaño medianas a grandes 2-4 mm ♥ Superficie brillo metálico ♥ Densidad opaca ♥ Elevación convexa ♥ En A. MacConkey colonias rosado fuerte


Salmonella typhimurium

Familia: Enterobacteriaceae

Bacterias del cepario que son <i>S. typhimurium</i>	EHS.t5- EHS.t7- EHS.t1-8- EHS.t26- EHS.t39.
Forma	Bacilos
Tinción	Gram negativo
Capacidad de oxígeno	Anaerobias facultativas, móvil
vía de transmisión	<ul style="list-style-type: none">♥ Inoculación♥ Ingestión
Medio de cultivo	Placa de Agar Salmonella y Shigella, Verde Brillante. Agar Entérico Hektoen, Verde Brillante, Agar Citrato de Simons.
Método de Identificación	<ul style="list-style-type: none">♥ Oxidasa negativa♥ Catalasa positiva♥ Producción de ácido sulfhídrico positivo♥ Producción de gas negativo♥ Citrato de Simons positivo♥ Fermentador de carbohidratos negativo♥ TSI superficie roja y profundidad amarilla
Morfología colonial	<div style="display: flex; align-items: center;"><ul style="list-style-type: none">♥ Colonias circulares de tamaño medianas a grandes 2-4 mm♥ Colonias negras♥ Opacas♥ Apariencia lisa♥ Lisas♥ Elevación convexa</div>

Enterococcus faecalis

Familia: Enterobacteriaceae

Bacterias del cepario que son <i>E. faecalis</i>	EDE.f40
Forma	Diplo o Estreptococo
Tinción	Gram positiva
Capacidad de oxígeno	Anaerobias facultativas, inmóvil
vía de transmisión	<ul style="list-style-type: none"> ♥ Inoculación ♥ Ingestión ♥ Contacto directo
Medio de cultivo	Placa de Agar Eosina y azul de metileno, MacConkey con Sorbitol, Salmonella y Shigella, Base Oxford.
Método de Identificación	<ul style="list-style-type: none"> ♥ Oxidasa negativa ♥ Catalasa negativa ♥ Producción de ácido sulfhídrico negativo ♥ Producción de gas negativo ♥ Citrato de Simons negativo ♥ Fermentador de carbohidratos positivo ♥ TSI superficie y profundidad amarillo ♥ En A. Eosina y azul de metileno tienen inhibición parcial son incoloras puntiformes ♥ Tiene inhibición de crecimiento en Agar Entérico Hektoen, MacConkey-Sorbitol y Medio Base Oxford.
Morfología colonial	<div style="display: flex; align-items: center;">  <ul style="list-style-type: none"> ♥ Colonias circulares de tamaño pequeño ♥ Colonias incoloras en su mayoría ♥ Borde uniforme ♥ Opacas ♥ Apariencia lisa ♥ Elevación convexa </div>

Bacillus subtilis

Familia: Enterobacteriaceae

Bacterias del cepario que son <i>B.subtilis</i>	EDB.s41-EDB.s44.
Forma	Bacilo
Tinción	Gram positiva
Capacidad de oxígeno	Aerobia
vía de transmisión	<ul style="list-style-type: none"> ♥ Inoculación ♥ Ingestión ♥ Inhalación ♥ Contacto directo
Medio de cultivo	Placa de Agar Extracto de levadura, compuestos de soya y Agar nutritivo como Luria Bertani.
Método de Identificación	<ul style="list-style-type: none"> ♥ Oxidasa negativa ♥ Catalasa positiva ♥ Producción de ácido sulfhídrico negativo ♥ Producción de gas negativo ♥ Citrato de Simons negativo ♥ Fermentador de carbohidratos positivo ♥ TSI superficie y profundidad amarillo
Morfología colonial 	<ul style="list-style-type: none"> ♥ Colonias circulares de tamaño pequeño 0.7-0.8 μm ♥ Colonias color gris a verde ♥ Borde uniforme ♥ Opacas ♥ Apariencia lisa ♥ Elevación convexa

Listeria

Familia: Listeriaceae

Bacterias del cepario que son <i>Listeria</i>	LisDL.i42.
Forma	Bacilos cortos
Tinción	Gram positiva
Capacidad de oxígeno	Anaerobia facultativa
vía de transmisión	<ul style="list-style-type: none">♥ Inoculación♥ Ingestión♥ Contacto directo
Medio de cultivo	Placa de Agar Base Oxford
Método de Identificación	<ul style="list-style-type: none">♥ Oxidasa negativa♥ Catalasa positiva♥ Producción de ácido sulfhídrico negativo♥ Producción de gas negativo♥ Citrato de Simons negativo♥ Fermentador de carbohidratos positivo♥ TSI superficie y profundidad amarillo
Morfología colonial	<ul style="list-style-type: none">♥ Colonias circulares de tamaño pequeño 0.7-0.8 µm♥ Borde uniforme♥ Opacas♥ Apariencia lisa♥ Elevación convexa♥ Colonias blanco a grisáceas, con halo negro sobre fondo claro



Pseudomona aeruginosa

Familia: Pseudomonadaceae

Bacterias del cepario que son <i>P.aeruginosa</i>	PseDP.a43.
Forma	Bacilo recto
Tinción	Gram negativa
Capacidad de oxígeno	Aerobia, móvil
vía de transmisión	<ul style="list-style-type: none"> ♥ Inoculación ♥ Ingestión ♥ Contacto directo
Medio de cultivo	Placa de Agar Base Centrimida, Luria Bertani, MacConkey
Método de Identificación	<ul style="list-style-type: none"> ♥ Oxidasa positiva ♥ Catalasa positiva ♥ Producción de ácido sulfhídrico negativo ♥ Producción de gas negativo ♥ Citrato de Simons positivo ♥ Fermentador de carbohidratos positivo ♥ TSI superficie y profundidad rojo
Morfología colonial	<div style="display: flex; align-items: center;">  <ul style="list-style-type: none"> ♥ Colonias circulares de tamaño grande 2-4 μm ♥ Colonias color verdoso fluorescente ♥ Borde uniforme ♥ Opacas ♥ Apariencia lisa ♥ Elevación convexa </div>

VIII. CONCLUSIONES

- El manual de bacterias del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria es un instrumento que permitió organizar, identificar y caracterizar la colección de bacterias de interés alimentario.
- La elaboración del manual didáctico en línea facilitó la organización, identificación y mantenimiento del cepario bacteriano del Laboratorio de Inocuidad Alimentaria.
- La versión del manual en línea permite de una manera didáctica abordar el manejo de bacterias en laboratorio <https://view.genial.ly/650c95710be06300118c42a2/presentation-copia-manual-de-pruebas-bioquimicas>
- Con la ayuda del manual se logró establecer un cepario de 44 ejemplares que deja las bases de la preservación de la biodiversidad, capacitación y aplicación científica.

IX. RECOMENDACIONES

- Es preciso continuar con otros protocolos que realicen pruebas de identificación molecular para tener una clasificación que incluya la parte fenotípica y genotípica.
- Se recomienda ampliar el manual incluyendo otros microorganismos de importancia agrícola, alimentaria e industrial.
- Experimentar con otros métodos de conservación como la liofilización.
- Hacer uso del manual como una herramienta de apoyo para profesores y alumnos que lo necesiten en su desarrollo profesional.

X. REFERENCIAS

- Alados., Alcaraz., Aller., Miranda., Pérez., & Romero. (2010). Diseño de un laboratorio de microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(7), 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.04.016>
- Aleyda, A., Galindo, A., Avedaño, R., & Pérez, C. (2012). *Biología Celular*. (Y. López & I. Ubaldo, Eds.; PRIMERA, Vol. 1). Dirección General de Escuelas Preparatorias: GGEP.
- Aponte Carlos. (2013). Fragmentos microbiológicos. *Revista Del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 44(1), 63–69.
- Arencibia, D., Rosario, L., & Gámez, R. (2009). Métodos generales de conservación de microorganismos. *FINLAY Ediciones*, 2–15.
- Baron, E., Miller, M., Weinstein, M., Richter, S., Gilligan, P., Thomson, R., Bourbeau, P., Carroll, K., Kehl, S., Dunne, M., Robinson-Dunn, B., Schwartzman, J., Chapin, K., Snyder, J., Forbes, B., Patel, R., Rosenblatt, J., & Pritt, B. (2013). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clinical Infectious Diseases*, 57(4), 22–121. <https://doi.org/10.1093/cid/cit278>
- Bergey, David. (1989). *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* (G. Garrity, D. Brenner, N. Krieg, & J. Stanley, Eds.; 2da ed., Vol. 2). Springer.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Brooks, G., Butel, J., & Morse, S. (2015). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. (16a., Vol. 1). Manual Moderno.
- Burguet, N., & Castillo, L. (2013). Control de calidad de los medios de cultivo utilizados en el monitoreo ambiental de las áreas clasificadas de producción. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 51(2).
- Calvo, J., & Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Calvo, J., & Martínez Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Carrillo, L., Morales, C., Pezoa, V., & Camacho, J. (2011). La historia de la ciencia en la enseñanza de la célula. *Técce, Epísteme y Didaxis: TED*, 29, 112–127.

- Carrión Camacho, M. R., Martínez Brocca, M. A., Paneque Sánchez Toscano, I., Valencia Martín, R., Palomino García, A., Muñoz Durán, C., Tamayo López, M. J., González Eiris Delgado, C., Otero Candellera, R., Ortega Ruiz, F., Sobrino Márquez, J. M., Jiménez García Bóveda, R., Fernández Quero, M., & Campos Pareja, A. M. (2013). Manual para la elaboración de documentos basados en la evidencia. Herramientas derivadas del conocimiento científico. *Revista de Calidad Asistencial*, 28(4), 254–258. <https://doi.org/10.1016/j.cali.2012.09.008>
- Cavallini, E., Gamboa, M., Hernández, F., & García, J. (2005). *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio* (PRIMERA, Vol. 2). Editorial UCR.
- Caycedo, L., Corrales, L., & Trujillo, D. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49–94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Chiappa, J., Galindo, M., & Cervantes, A. (2009). *Introducción a los modelos matemáticos de crecimiento y aplicaciones en sistemas biológicos* (1ra edición, Vol. 1). PAPIME PE.
- Corrales, L., & Caycedo, L. (2020). Principios fisicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología Principios fisicoquímicos de los colorantes. *Nova*, 18(33), 1–28. <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>
- Crosby, P. B. (1990). *Hablemos de Calidad* (2da ed.). MC GRAW-HILL.
- Curtis, H., Barnes, S., & Schnek, A. (2011). Biología. In *Bacteria y Archaea: Vol. (1) 7ma edicion.* (7th ed., p. 459). Editorial Médica Panamericana.
- Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología . *Seimc*, 1(1), 1–52.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit J Exp Pathol*, 10(3), 226–236.
- Galván, H. (2012). La necesidad e importancia del control de calidad en mamografía. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 11(4), 246–250.
- García, E. (2013a). *Implementación de un método de conservación de cepas bacterianas*. [Tesis]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García, E. (2013b). *Implementación de un método de conservación de cepas bacterianas* [Tesis]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- García Rodríguez, J. A. (2006). *Antimicrobianos en medicina* (2da ed.). Sociedad Española de Quimioterapia.
- Gobernado, M., & López, J. (2003). Identificación bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Mibrobiología Clínica*, 21(52), 54–60.
- Gómez, A. (2004). Del microscopio a la medicina microbiana. *Universitas Scientiarum*, 9(2), 7–14.

- Gómez, G., & Bastida, C. (2006). Optimización de medios de cultivo para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*, 27(3), 17–24.
- González, R., Elizalde, B., Cortés, M., & Orduño, M. (2020). *Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico* (Vol. 1). UNAM, FES Zaragoza.
- Gutiérrez, J., Luna, L., Mendoza, I., Díaz, G., Burguete, J., & Feliciano, J. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2).
- Hernández, A. (2003). Microbiología Industrial. In *Microbiología Industrial* (PRIMERA, Vol. 1, pp. 13–29). EUNED. Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Hernández., Celorrio., Lapresta., & Solano. (2014). Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(10), 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.04.003>
- Herrera, M., & Campos, M. (2005a). Control de calidad para un Laboratorio de Microbiología. *Revista Médica Del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera.*, 40(1).
- Herrera, M., & Campos, M. (2005b). Control de Calidad para un Laboratorio de Microbiología. *Revista Médica Del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 40(1).
- Leslie, H., & Barbara, K. (1991). *Bacteria: Living resources for biotechnonology* (FIRST, Vol. 1). University Press, Cambridge.
- Lopardo, H. (2016). *Introducción a la microbiología clínica*. (PRIMERA, Vol. 1). exactas, edulp.
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación En Discapacidad*, 3(1), 10–18.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). Biología de los microorganismos. In Romo Miguel Martín & Jaramillo Elena (Eds.), *Biología de los microorganismos*. (14th ed., pp. 400–434). PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
- Martínez. (2008). Muerte bacteriana y heterorresistencia a los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(8), 481–484. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(08\)72774-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(08)72774-5)
- Meza, U., Romero, A., Licón, Y., & Sánchez, S. (2010). La membrana plasmática; Modelos, balsas y señalización. *Revista de Educación Bioquímica*, 29(4), 125–1134.
- Mühlhauser, M., & Rivas, L. (2014). Laboratorio de microbiología: conocimientos básicos para un clínico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 569–579. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70072-0](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70072-0)
- Murray, A., Kenig, F., Fritsen, C., McKay, C., Cawley, K., Edwards, R., Kuhn, E., McKnight, D., Ostrom, N., Peng, V., Ponce, A., Priscu, J., Samarkin, V., Townsend, A., Wagh, P., Young,

- S., Yung, P. T., & Doran, P. (2012). Microbial life at -13°C in the brine of an ice-sealed Antarctic Lake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), 20626–20631. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208607109>
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfauer, M. (2021). *Microbiología médica* (9na edición, Vol. 7). ELSEVIER.
- Neider, J. (2018). *Mantenimiento y Conservación de cepas de referencia para el Control de Calidad de los Métodos de análisis del Laboratorio de Microbiología* [Tesis]. Universidad de Pamplona.
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>
- Orellana, O. (2002). Perspectivas de la secuenciación de genomas bacterianos: nuevas estrategias en el desarrollo de terapias antimicrobianas. *Revista Chilena de Infectología*, 19. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182002019100009>
- Oromí Durich, J. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Integral*, 36(10), 367–370.
- Parreño Herrera, I. V. (2002). *Elaboración de manuales administrativos y de procesos en la Empresa Cerámica Novel 3, para lograr mayor eficiencia en los trabajadores* [Tesis]. Escuela Politécnica del Ejército Extensión-Latacunga.
- Porres, N., & Ruiz, E. (2018). *Microbiología clínica* (PRIMERA). Paraninfo.
- Quiroga Leos, G. (1994). *Guía técnica para la elaboración de manuales de procedimientos* (pp. 10–45). Trillas, S.A de C.V.
- Real Academia Española. (n.d.). *Microbiología*. 2022.
- Robles, J., & Ayala, L. (2016). Identificación de la diversidad de bacterias presentes en pantallas de teléfonos celulares. *CLIDi*, 1–4.
- Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245.
- Rodríguez Valencia, J. (2012). *Cómo elaborar y usar los manuales administrativos* (4ta ed.). CENGAGE Learning.
- Rodríguez. (2006). La desinfección-antisepsia y esterilización en la atención primaria de salud. Laboratorios. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 22(3).
- Ruiz, E., & Ortega, C. (2014). Tecnologías de la información y la comunicación para la innovación educativa. *Perfiles Educativos*, 36(144), 214–218. [https://doi.org/10.1016/S0185-2698\(14\)70633-6](https://doi.org/10.1016/S0185-2698(14)70633-6)

- Sánchez, I., García, J., González, J., & Orta, N. (2019). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(2), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.12.002>
- Soriano, F. (2009). *Corynebacterium urealyticum*: de la clínica a la secuenciación completa del genoma. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 5–6. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.04.002>
- Toro, D. (2005). *Manual de Introducción al Laboratorio de Microbiología* (PRIMERA, Vol. 1). Centro Editorial.
- Torrades, S. (2001). Uso y abuso de los antibióticos. *Offarm*, 20(8), 82–93.
- Uruburu, F., Juarros, E., Torjada, C., & García, M. (2000). Storage of stock cultures of filamentous fungi at -80°C: effects of different freezing-thawing methods. *Microbiología. SEM*, 9, 28–33.
- Vargas, T., & Vargas, K. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49(2), 2594–2598.
- Velasco, E. (2015). El sexo de las bacterias. *Biol. on-Line*, 4(2).
- Vila, J., Soriano, A., & Mensa, J. (2008). Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(1), 48–55. <https://doi.org/10.1157/13114395>
- Ward, P., & Roy, D. (2005). Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. *Le Lait*, 85(1–2), 23–32. <https://doi.org/10.1051/lait:2004024>
- Weng, Z., Díaz, E., & Álvarez, I. (2005). Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Revista Cubana de Higiene, Epidemiología y Microbiología*, 43(3), 1–4.

