



**METABOLISMO BACTERIANO,
IDENTIFICACIÓN Y TAXONOMÍA**

**MICROBIOLOGIA
AMBIENTAL**

INDICE:

OBJETIVOS	3
INTRODUCCIÓN	3
Prueba de oxidación fermentación (OF)	5
PRUEBAS PARA FERMENTACIONES	7
TSI: Pruebas con agar hierro Kligler (glucosa/lactosa) y agar hierro triple azúcar (glucosa/lactosa/sacarosa)	7
Reacción de Rojo de Metilo	9
Reacción de Voges Proskauer	11
OXIDACIÓN	12
Observación de la necesidad de oxígeno de las bacterias	12
Prueba de la oxidasa	13
Prueba de la catalasa	16
Prueba de reducción de nitrato	17
Reducción de sulfatos	19
ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE LOS HIDRATOS DE CARBONO	21
Utilización de azúcares como única fuente de carbono	21
HIDRÓLISIS DE POLISACÁRIDOS	21
Hidrólisis de almidón	21
Disacáridos: Prueba de la β -galactosidasa (ONPG)	23
ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE PROTEINAS Y AMINOACIDOS	25
Utilización de aminoácidos como única fuente de carbono	25
Prueba de la fenilalanina	25
Prueba del indol (medio de cultivo SIM)	27
Medio de Moller	29
Agar Lisina Hierro (LIA)	¡Error! Marcador no definido.
Hidrólisis de gelatina	33
Hidrólisis de caseína	34
Test de la coagulasa	34
ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE LOS LIPIDOS	36
Prueba de la lecitinasa	36
Hidrólisis de Tween 80	37
ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE EL DNA	¡Error! Marcador no definido.
ACCIÓN DE MICROORGANISMOS SOBRE EL CITRATO	38
ACCIÓN DE MICROORGANISMOS SOBRE LA UREA	39
IDENTIFICACIÓN	41
Identificación metabólica de la bacteria que se estudio en el práctico	44
TAXONOMÍA (LA CIENCIA DE LA CLASIFICACIÓN)	45
Taxonomía numérica	46

Objetivos:

- * Aprender a interpretar algunas pruebas bioquímicas de identificación bacteriana.
- * Conocer el metabolismo de bacterias a través de las reacciones que se presentan en el trabajo práctico.
- * Identificación de bacterias por método bioquímico, manejo de tabla de bionúmero y tablas dicotómicas. Ventajas y desventajas.
- * Adquirir conocimientos de taxonomía. Utilización de programas estadísticos.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son capaces de modificar el ambiente en que se encuentran tomando sustancias, como hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos, compuestos inorgánicos y liberando productos de desechos para ellas que modifican el medio y que se puede evidenciar en algunos casos por ejemplo con la utilización de sustancia como indicadores de pH, etc.

Las interacciones que cada tipo de bacteria establece con el entorno son propias y características de cada género y especie. Esta especificidad depende del genotipo de la bacteria y se expresa con determinadas enzimas, es por esto que las podemos identificar a través de su metabolismo. Hoy podemos identificar a una bacterias porque alguien trabajo en taxonomía, que es la ciencia que se encarga de clasificar a las bacterias y generó un sistema de clasificación que nos permite, en esta caso, través de pruebas metabólicas identificatorias (manual Bergey) otorgar un nombre a la bacterias que estamos estudiando; esto lo veremos al final del trabajo práctico.

CAPACIDAD DE OXIDACION (Respiración) O FERMENTACION DE LOS MICROORGANISMOS Y REACCIONES INVOLUCRADAS EN AMBAS.

Los microorganismos generan energía en forma de ATP por medio de dos procesos alternativos: **la fermentación y la respiración aerobia o anaerobia**. Existen microorganismos que son capaces de utilizar los dos tipos de metabolismo, usando uno u otro según las condiciones del medio.

Se puede determinar la capacidad de una bacteria de oxidar o fermentar un compuesto orgánico a través del medio de cultivo de oxidación-fermentación (OF),

Respiración:

Es también un proceso metabólico generador de ATP en el que tanto compuestos orgánicos como inorgánicos sirven como donadores de electrones (oxidándose) y como últimos aceptores de electrones actúan compuestos inorgánicos (reduciéndose).

- ➔ Respiración aeróbica: **el microorganismo usa el O₂ como aceptor de electrones**
- ➔ Respiración anaeróbica, **las sustancias inorgánicas**, especialmente nitratos y sulfatos (raramente carbonatos), sirven como aceptores de electrones para suministrar energía.

Una característica distintiva de los procesos respiratorios, es la presencia en la célula de compuestos que pueden ser oxidados y reducidos en forma reversible, es decir que pueden aceptar electrones de un compuesto, dárselos a otro y en algunos casos liberar energía; formando la cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria.

Para determinar la capacidad oxidativa de un microorganismo, se utilizan además de la prueba de oxidación-fermentación, las pruebas de observación de la necesidad de O₂, de citocromo oxidasa, y de reducción de nitrato y sulfato.

Fermentación:

Es un proceso metabólico generador de ATP en el **que compuestos orgánicos sirven de donadores de electrones (oxidándose) y como aceptores de electrones (reduciéndose)**. Los hidratos de carbono son los principales sustratos.

La fermentación puede efectuarse por varias vías:



Además de la prueba de OF, para la determinación de la fermentación, se usan las reacciones de Rojo de Metilo y Voges Proskauer, para diferenciar fermentaciones.

PRUEBA DE OXIDACION FERMENTACION (OF):

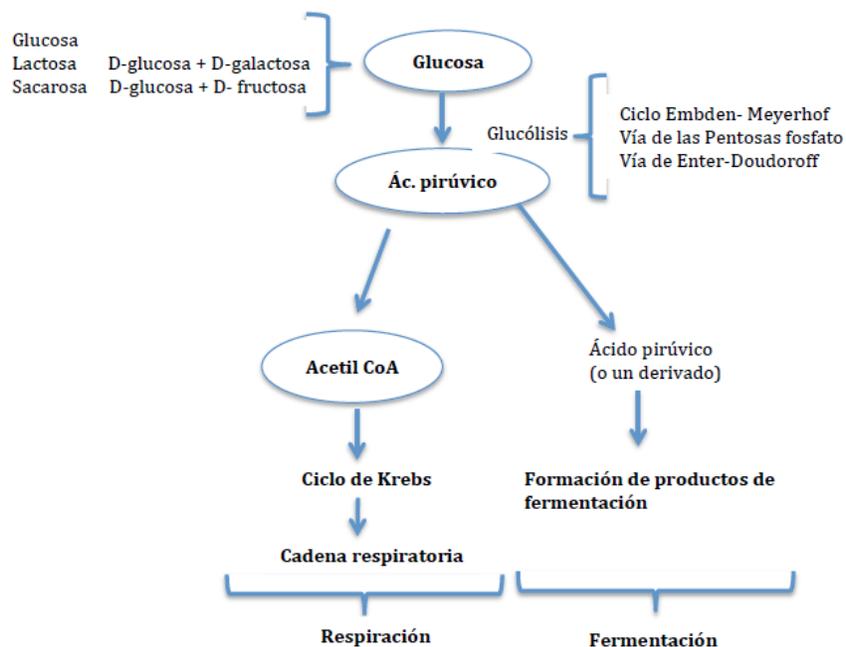
OBJETIVO:

Determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono

Bases bioquímicas:

La utilización de los hidratos de carbono por microorganismos, tiene lugar mediante dos posibles procesos: la fermentación o la oxidación. Algunas bacterias pueden metabolizar un hidrato de carbono (manifestado por la producción de ácido), sólo en condiciones aeróbicas, mientras que otras producen ácido en forma aeróbica o anaeróbica.

Fig.1. Esquema general de respiración y fermentación



Por estas vías pueden utilizarse disacáridos y polisacáridos que son llevados previamente a glucosa o a otro intermediario. Los disacáridos como la lactosa y sacarosa deben ser desdoblados previamente fig 1.

En los organismos aeróbios, con metabolismo oxidativo, el ácido pirúvico es oxidado de manera cíclica por la ruta del Ciclo de Krebs generando ATP, a través del transporte de electrones en la cadena respiratoria donde el oxígeno es el receptor final de electrones.

Las fermentaciones producen **acidez más elevada que el proceso oxidativo**, y en ellas el receptor final de electrones es un compuesto orgánico.

Medio de Cultivo	
Peptona	2,0 g
Cloruro de Sodio	5,0 g
Fosfato de Potasio	0,3 g
Agar	2-3 g
Indicador Azul de bromotimol	0,03-0,08 g
Agua destilada c.s.p	1000 ml
pH	6,8

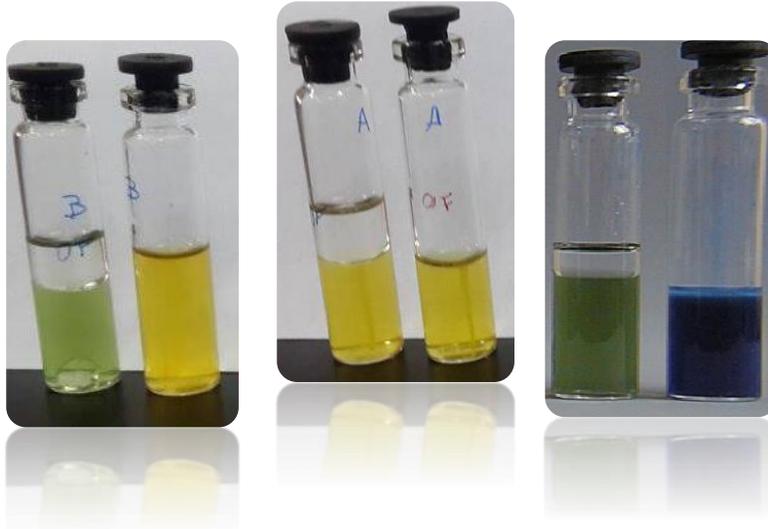
Se esteriliza, se agrega 1% del hidrato de carbono a ensayar (mono y disacárido) y luego se distribuyen 3 a 4 ml por tubo en columna (la columna debe tener 3cm de alto). Para cada prueba se utilizan dos tubos los cuales se inoculan por punción, a uno se le colocan unas gotas de vaselina estéril sobre el medio de cultivo para probar la fermentación y al otro no, para determinar la oxidación.

Interpretación de Resultados	
Amarillo	Ácido
Azul	Alcalino
Verde	Sin cambio

Si es:	Tubo abierto	Tubo cubierto	Ej de bacteria
Oxidación (O)	Amarillo (A)	Verde (-)	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
Fermentación (F) (anaerogénica)	Amarillo (A)	Amarillo (A)	<i>Enterobacterias</i>
Fermentación (F) (aerogénica)	Amarillo (AG)	Amarillo (AG)	<i>Enterobacterias</i>
Ni fermentación, Ni oxidación	Azul o verde (-)	Verde (-)	<i>Alcaligenes faecalis</i>

A: ácido, AG ácidos gas

Imágenes 1,2 y 3. Ejemplos de Pruebas OF.



PRUEBAS PARA FERMENTACIONES

TSI: PRUEBA CON AGAR HIERRO KLIGLER (glucosa/lactosa) y AGAR HIERRO TRIPLE AZÚCAR

OBJETIVO:

Determinar la capacidad de un organismo de fermentar la glucosa y la lactosa y/o sacarosa, con producción o no de gases y evidenciar la posible producción de ácido sulfhídrico.

Bases bioquímicas:

El medio TSI contiene 3 hidratos de carbono: glucosa con concentración del 0,1% y lactosa y sacarosa al 1%. Los microorganismos pueden: a) fermentar sólo la glucosa, b) fermentar los tres hidratos de carbono y c) no fermentar ni la glucosa ni la lactosa y/o sacarosa.

La fermentación puede efectuarse con producción o no de gases (CO₂ + H₂).

a) Fermentación de la glucosa únicamente (alcalino/ácido):

En esta fermentación se observa el pico de flauta alcalino (rojo) y la columna ácida (amarilla). Los microorganismos utilizan primero la glucosa, acidificándose todo el medio y virando el indicador al amarillo. Después de 18 a 24 hs. la glucosa (0,1%) ha sido consumida y el organismo comienza a usar las peptonas aeróbicamente

alcalinizando el pico (vira nuevamente a rojo) por liberación de NH₃. Estos microorganismos son incapaces de fermentar la lactosa y/o sacarosa.

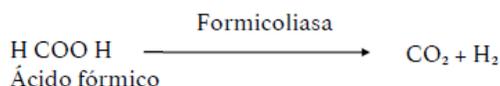
b) Fermentación de la lactosa y/o sacarosa y la glucosa (ácido/ácido):

Se observa un pico de flauta y una columna ácida. La lactosa y la sacarosa se encuentran al 1% (diez veces más que la glucosa); los microorganismos utilizan primero la glucosa y cuando se termina, comienzan a usar la lactosa y/o sacarosa. En un tiempo de incubación de 18/24 hs. la lactosa no se ha consumido totalmente y se mantiene la acidez en todo el tubo.

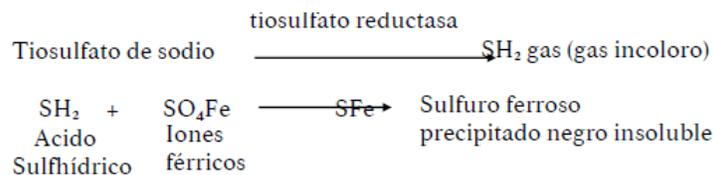
c) No hay fermentación de la lactosa ni de glucosa (alcalino/sin cambio):

Hay microorganismos incapaces de fermentar los hidratos de carbono y utilizan las peptonas en forma aeróbica en el pico, quedando el fondo sin cambio de color (alcalino/sin cambio).

Producción de gas, el gas se produce a partir del ácido fórmico, obtenido de la fermentación de la glucosa.



Producción de SH₂, el medio contiene un indicador de la producción de sulfhídrico = sulfato ferroso.



Medio de Cultivo - Fórmula			
Extracto de carne	3,0 g	Sulfato ferroso	0,2 g
Extracto de levadura	3,0 g	Cloruro de sodio	5,0 g
Peptona	15 g	Tiosulfato de sodio	0,3 g
Proteosa peptona	5,0 g	Rojo fenol	0,024 g
Lactosa	10 g	Agar	15 g
Sacarosa	10g	Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Glucosa	1 g	pH	7,4

Luego de la esterilización en autoclave se distribuye en pico de flauta y columna (3 cm c/u). Se siembra por estría y por punción una cepa de 18-24 hs y se incuba 24 hs a 37°C.

Interpretación de resultados:

<i>Píco</i>	<i>Columna</i>	<i>Resultado</i>	<i>Microorganismos</i>
<i>Rojo -</i>	<i>Amarillo +</i>	<i>Fermentación de glucosa.</i>	<i>Shigella sp.</i>
<i>Amarillo +</i>	<i>Amarillo + Gas</i>	<i>Fermentación de glucosa y lactosa/sacarosa.</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Amarillo +</i>	<i>Ennegrecimiento +</i>	<i>Producción de SH_2.</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Amarillo +</i>	<i>Amarillo + Gas</i>	<i>Producción de gas a partir de glucosa.</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Rojo -</i>	<i>Rojo -</i>	<i>Ni fermentación de glucosa, ni de lactosa y/o sacarosa.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Imagen 4. Ejemplos de pruebas TSI.



REACCIÓN DE ROJO DE METILO, FERMENTACIÓN FÓRMICA O ÁCIDO MIXTA:

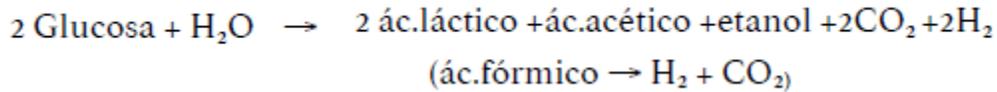
OBJETIVO:

Comprobar la capacidad de un microorganismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del sistema.

Bases bioquímicas:

El rojo de metilo es un indicador de pH con un rango entre 6 (amarillo) y 4.4 (rojo). El pH al cual el rojo de metilo detecta ácidos es mucho más bajo que el pH correspondiente a otros indicadores utilizados en medios de cultivo bacteriológicos. Por lo tanto, para provocar un cambio de color, el microorganismo en estudio debe producir grandes cantidades de ácidos (láctico, acético, fórmico) provenientes de la utilización de la glucosa.

Fermentación ácida mixta:



Los organismos rojos de metilo negativos, también producen ácidos (acético, láctico y fórmico) pero tienen una menor concentración de iones H, porque continúan metabolizando los productos de la fermentación por descarboxilación. Además, por debajo de un pH 6,3, el ácido acético es convertido en acetoina y 2,3 butanediol, productos finales neutros, llevando el pH a la neutralidad.

Medio de Cultivo	
Peptona	0,5 g
PO4H2K	0,5 g
Glucosa	0,5 g
Agua destilada c.s.p	100 ml

Se distribuyen 3 ml por tubo.

Reactivo para el revelado-Indicador de ph Rojo de metilo:

1. Disolver 0,1 g. de Rojo de metilo en 300 ml de alcohol etílico.
2. Agregar 200 ml de agua destilada a la mezcla alcohol-indicador.

Se toman de 0,5 a 1 ml de cultivo en caldo con desarrollo de 24 hs. Y se agrega una gota de reactivo.

Interpretación de Resultados	
Rojo	Productos ácidos
Sin cambio	Productos neutros

Color del tubo:	Resultado	Microorganismo
Amarillo	-	<i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i>
Rojo	+	<i>Escherichia coli</i> y otras <i>Enterobacterias</i>

+ positivo, - negativo

Imagen 5. Prueba Rojo de Metilo positiva (izq.) y negativa (der.).



REACCIÓN DE VOGES PROSKAUER, FERMENTACIÓN BUTILENGLICÓLICA:

OBJETIVO:

Determinar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbonil (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa (fermentación butilen-glicólica).

Bases bioquímicas:

La reacción de V.P. se basa en la detección de acetoína a partir de la fermentación butanodiólica de la glucosa. A partir del ácido pirúvico, una bacteria puede seguir muchas vías según su sistema enzimático, una de éstas es la fermentación butanodiólica, cuyo producto final es el 2,3 butanodiol, en que la acetoína es el precursor. La prueba V.P. se basa en la detección de éste último. La acetoína que se produce en la fermentación, cuando reacciona con el hidróxido de potasio (KOH al 40% p/v) es oxidada, en presencia de oxígeno atmosférico, a diacetilo, el que a su vez reacciona con los grupos guanídicos de la arginina, que está presente en las peptonas que constituyen el medio, dando una coloración rojiza.

Medio de cultivo → Es el mismo que para la reacción de rojo de metilo.

Reactivo para el revelado:

A) Alfa Naftol 5%

Alfa Naftol. 5 g

Etanol absoluto c.s.p 100 ml

B) KOH 40%

KOH 40 g

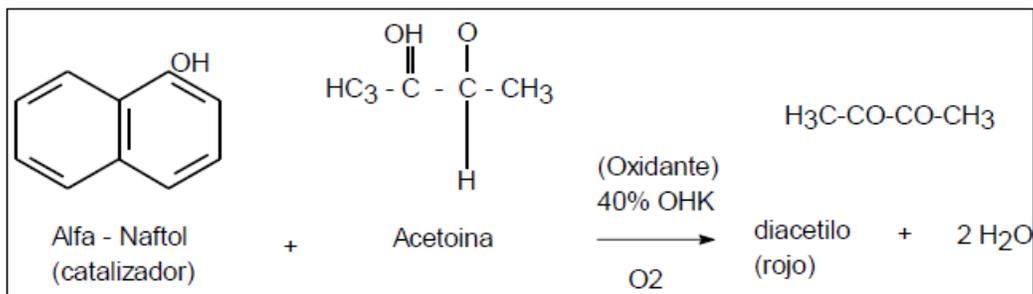
H₂O destilada 100 ml

A 1 ml de caldo de cultivo con desarrollo de 48 hs se agregan 0,5ml de solución alfa naftol y luego 0,9ml de solución acuosa de OHK al 40%.

El reactivo alfa naftol actúa como catalizador intensificando el color, lo que aumenta la sensibilidad de la reacción.

El reactivo KOH actúa como agente oxidante para apresurar la oxidación de la acetoína en diacetilo.

Fig.2. Esquema de la reacción de la acetoína con los reactivos de la prueba VP.



Después del agregado de alfa-naftol e OHK debe agitarse suavemente el tubo para exponer el medio al O₂ atmosférico y oxidar la acetoina, cuando existe, en diacetilo.

Interpretación de Resultados	
Rojo-Pardo	Positivo
Sin cambio	Negativo

Color	Resultado	Microorganismo
Amarillo	-	<i>Escherichia coli, Citrobacter</i>
Rojo - Rosado	+	<i>Klebsiella, Enterobacter</i>

OBSERVACIÓN DE LA NECESIDAD DE OXÍGENO DE LAS BACTERIAS:

OBJETIVO:

Determinación de bacterias aerobias estrictas, microaerófilas, anaerobias estrictas y facultativas.

Bases Bioquímicas:

Las bacterias aerobias estrictas requieren O₂ como aceptor final de electrones, por lo tanto solo crecerán en contacto con el oxígeno atmosférico. Las microaerófilas crecen con incremento de CO₂ al 5-10% y tensión de O₂ reducida. Las bacterias anaerobias utilizan compuestos inorgánicos distintos al O₂, algunas son anaerobias estrictas siendo inhibidas por el O₂, mientras que las facultativas crecen también en presencia de O₂.

Medio de Cultivo	
Peptona	15,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
Glucosa	5 g
ClNa	2,5 g
L-cistina	0,2 g
Tioglicolato de sodio	0,5 gl
Rezarsurina	0,001 g
Agar	3 g

Se distribuye en tubos de con una altura de medio de cultivo de 4cm, dejando cámara de aire y se siembra por punción. Se lee el cultivo de 24 hs.

Interpretación de los resultados:

<i>Respiración</i>	<i>Resultado</i>	<i>Ej Microorganismo</i>
<i>Anaerobia facultativa</i>	<i>Crece en todo el medio.</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Aerobia estricta</i>	<i>Crece en la parte superior.</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Anaerobia estricta</i>	<i>Crece en el fondo.</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Microaerófila</i>	<i>Crece cerca de la superficie.</i>	<i>Cándida sp.</i>

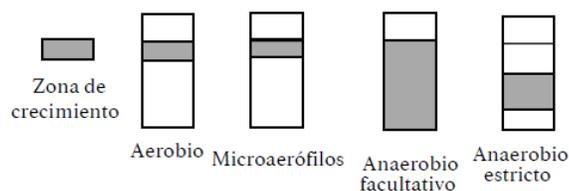
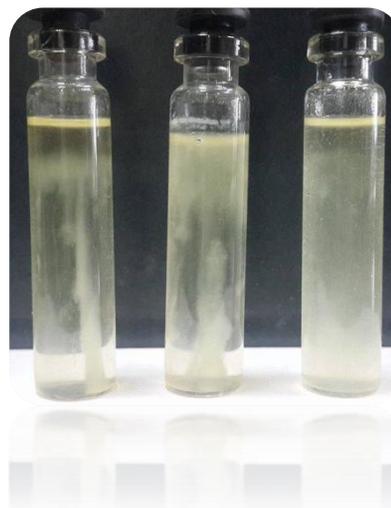


Imagen 6. Bacterias microaerófilas (izq.), bacterias aerobias (centro) y anaerobias facultativas (der.).



PRUEBA DE LA OXIDASA:

OBJETIVO:

Determinar la presencia de un componente de la cadena respiratoria, la enzima citocromo oxidasa que reduce al oxígeno molecular transfiriendo los electrones de las reducciones que se producen en las oxidaciones celulares.

Bases bioquímicas:

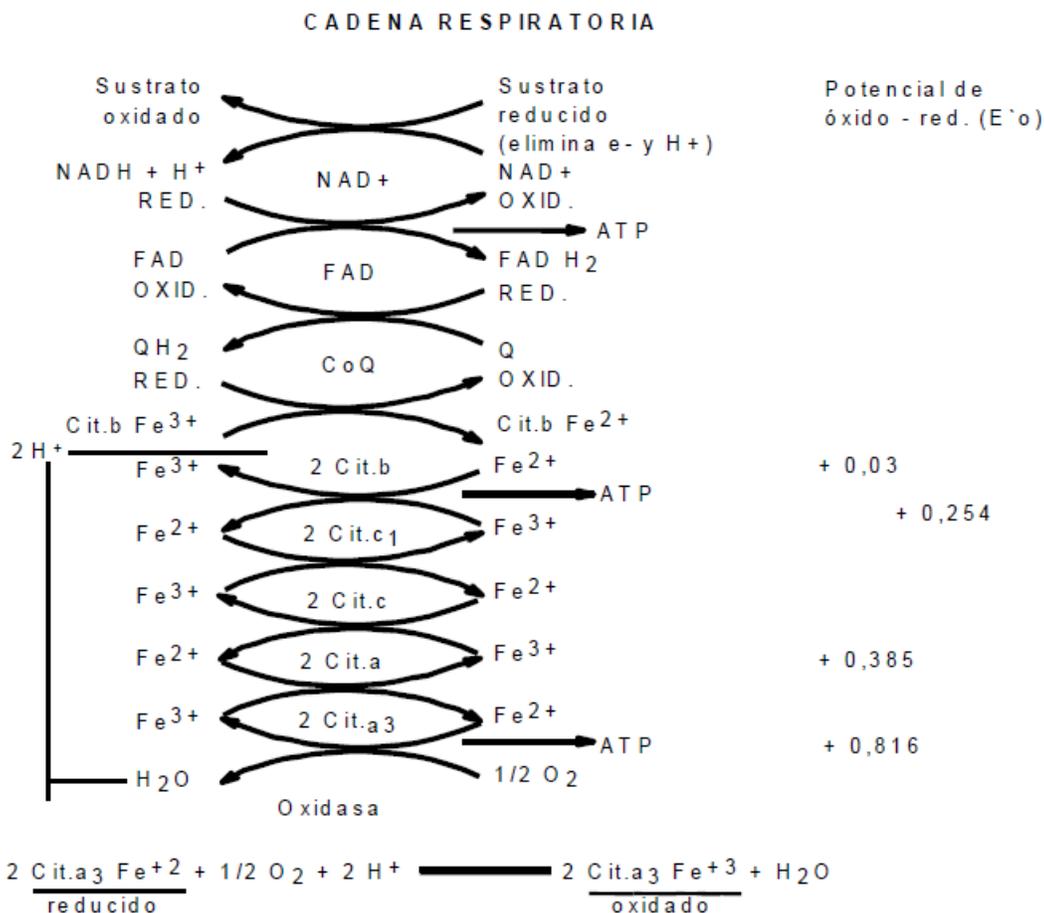
Todas las bacterias aerobias obtienen su energía por medio de la respiración, proceso responsable de la oxidación de diversos sustratos.

La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa, que se encuentra por lo general en los organismos aerobios, y los hace capaces de utilizar el O₂ como aceptor final de hidrogeno para reducir el O₂ en peróxido de hidrógeno, el último enlace de la cadena de la respiración aeróbica.

La reacción oxidasa positiva está limitada a aquellos organismos capaces de desarrollar en presencia de O₂ y de producir la enzima catalasa.

Cadena respiratoria:

Los e- eliminados del sustrato entran en la cadena y se produce el pasaje de e- a través de una serie de transportadores que se oxidan y se reducen, aceptando e- de compuestos reducidos para transferirlos finalmente al O₂. Cada transferencia de e- se asocia con una disminución de la energía libre, que permite la síntesis de ATP.



Los citocromos actúan secuencialmente, oxidándose y reduciéndose (dependiendo del estado del átomo de Fe contenido en su molécula) transportando electrones de la coenzima Q al O₂.

La citocromo oxidasa en presencia de O₂ atmosférico, citocromo C y un reactivo de oxidasa, oxida al reactivo, para formar un compuesto coloreado. Los diversos colorantes usados para la prueba de oxidasa son aceptores de electrones artificiales. Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo, pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa.



Modos de empleo:

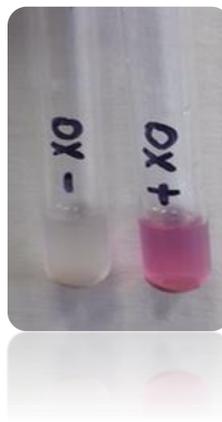
Se utilizan discos comerciales que se guardan a 4-8°C. Para su uso se efectúa una suspensión bacteriana en un tubo de hemólisis y se agrega un disco impregnado con el reactivo. Si los microorganismos poseen la enzima citocromo-oxidasa, la suspensión toma una coloración rosada fuerte.

Otra forma, se deja caer una gota de la solución sobre una colonia. En caso de positividad la colonia toma un color rosado.

Interpretación y control de calidad:

Color	Resultado	Microorganismo
<i>Sin cambio de coloración</i>	-	<i>Escherichia coli</i>
<i>Rosado fuerte</i>	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Imagen 7. Prueba de Oxidasa negativa (izq.), Oxidasa positiva (der.).



PRUEBA DE LA CATALASA:

OBJETIVO:

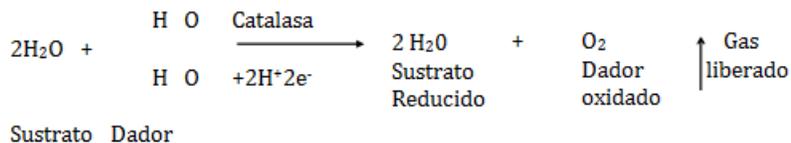
Comprobar la presencia de la enzima catalasa.

Bases bioquímicas:

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromos. Por lo general, los organismos que no poseen el sistema de citocromos, carecen también de la enzima catalasa. Esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en O₂ y H₂O. Químicamente es una hemoproteína, de estructura similar a la hemoglobina, salvo que los cuatro átomos de Fe se encuentran en estado oxidado (Fe⁺⁺⁺) en vez de reducido (Fe⁺⁺). El peróxido de hidrógeno se forma como un producto final oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares. Las oxidaciones de flavoproteínas por O₂ conducen a la formación de peróxidos cuya acumulación es tóxica para las bacterias provocando su muerte.

Reactivo:

Peróxido de hidrógeno al 3%. Mantener en frasco color caramelo y refrigerado.



H₂O₂: Proviene de la degradación aeróbica de los azúcares.

Técnicas:

Técnicas del portaobjeto:

Con palillo de madera transferir bacterias del centro de una colonia bien aislada a la superficie de un portaobjeto limpio. Añadir 1 o 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%.

Método en tubo o en placa de agar:

Añadir unas gotas del peróxido diluido al 3%, directamente sobre la superficie del desarrollo del pico de flauta o placa.

Interpretación del resultado:

La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas (O₂) se considera reacción positiva.

<i>Microorganismo</i>	<i>Resultado</i>
<i>Pseudomonas, Micrococcus, Staphylococcus</i>	+
<i>Streptococcus</i>	-

Imagen 8. Catalasa positiva.



PRUEBA DE REDUCCIÓN DE NITRATO:

OBJETIVO:

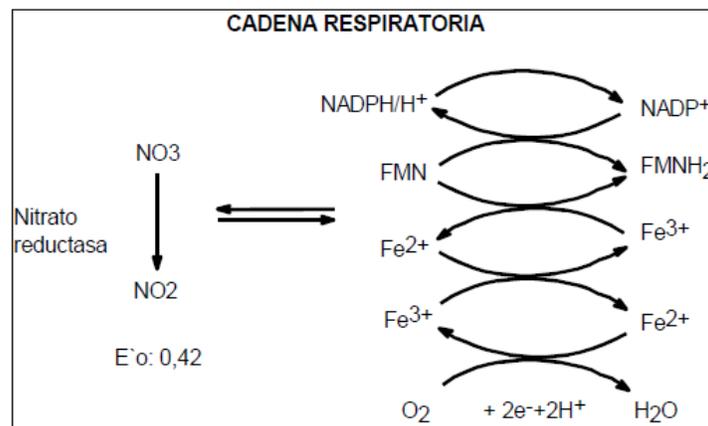
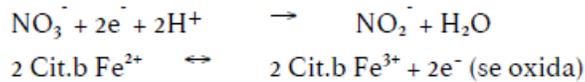
Determinar la capacidad de un microorganismo de respirar nitrato reduciéndolo a nitrito o a nitrógeno libre.

Bases bioquímicas:

La reducción de nitrato a nitrito y a gas nitrógeno tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo utiliza nitrato como aceptor de electrones.

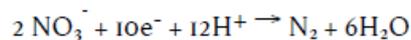
El nitrato actúa como el oxidante final en los sistemas citocromo.

REDUCCION DE NITRATO A NITRITO



Nitrato reductasa: acopla la reducción de nitrato con la oxidación de un citocromo.

REDUCCION DE NITRATO A NITROGENO MOLECULAR (DENITRIFICACION)



Medio de cultivo → Se utiliza indistintamente caldo o agar nutritivo con: 1% de NO₃K.

Reactivos:

La reducción de La reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻ se evidencia por el agregado de reactivos A y B de Peter Griess.

Reactivo A:

Alfa-naftil amina 0,5 g
 Ácido acético 5N 100 ml

Reactivo B

Ac. Sulfanílico 0,8 g
 Ac. Acético 5N 100 ml

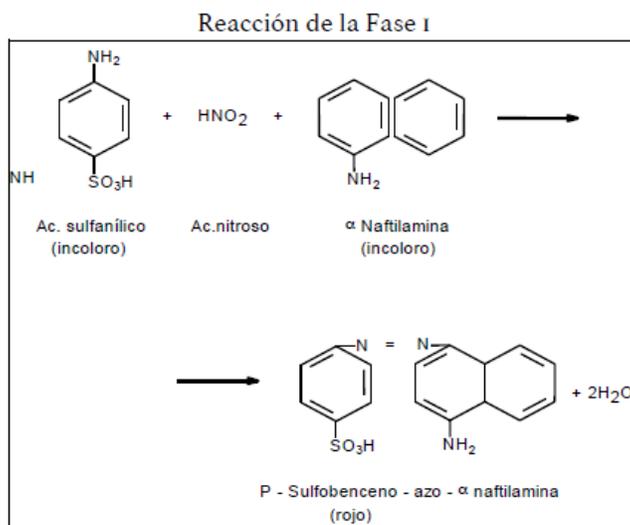
Fase 1:

Agregar directamente al medio de cultivo con 1% de nitrato (previamente inoculado e incubado a 37°C) 1 ml de reactivo A y luego 1 ml de reactivo B.

La reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻, está indicada por la aparición de color rojo intenso cuando el nitrito reacciona con el ácido sulfanílico y el alfa naftilamina formando el p-sulfo benceno-azo alfa naftil amina (sal diazónica). Si da resultado negativo se continúa con la fase 2.

Fase 2:

Método de reducción del zinc: agregar directamente al tubo que contiene los reactivos A y B, una pizca de polvo de zinc.



Interpretación:

Fase 1:

Prueba positiva: color rosado o rojo intenso. $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$.

Prueba negativa: no desarrolla color. Se sigue con la fase 2.

Fase 2:

Prueba positiva: no se desarrolla color, el organismo redujo el nitrato en nitrito y luego redujo nuevamente el nitrito.

Prueba negativa: color rosado o rojo intenso, el nitrato no ha sido reducido por el organismo. El zinc redujo el NO_3^- a NO_2^- .

<i>Ej. Microorganismo</i>	<i>Resultado</i>
<i>Pseudomonas cepacia</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	+

REDUCCIÓN DE SULFATOS:

(Tesis doctoral Dr. O.Pucci, Stanier)

OBJETIVO:

Determinar la capacidad de ciertos microorganismos de utilizar el sulfato como aceptor final de electrones, reduciéndolo a sulfuro.

Bases Bioquímicas:

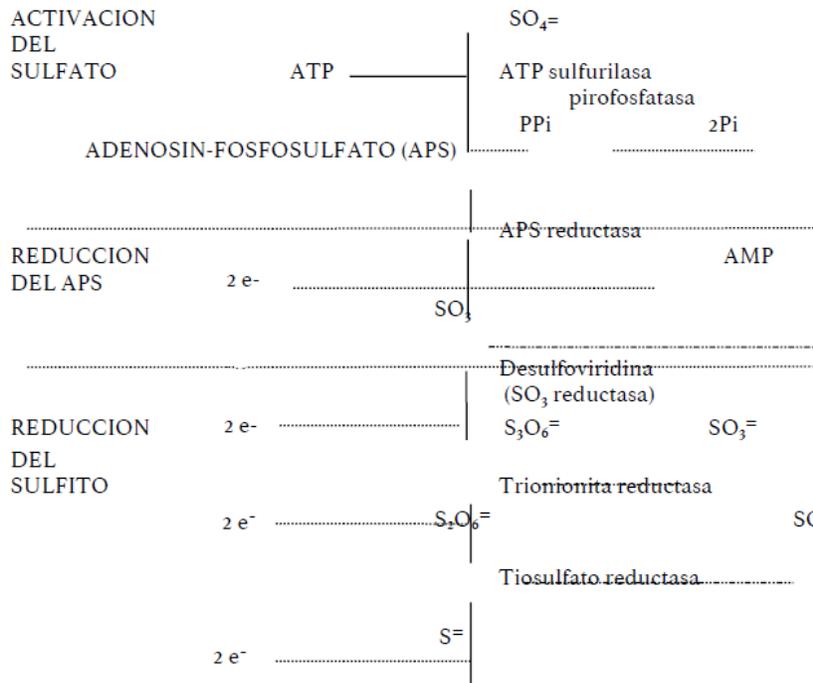
Algunos microorganismos son capaces de efectuar una reducción desasimilatoria de sulfatos y utilizarlo como oxidante en el catabolismo de compuestos orgánicos, reduciéndolo a sulfuro. Este proceso se denomina "respiración de sulfatos".

La ATP sulfurilasa se activa en medio anaeróbico.

Los desulfovibrios, anaerobios estrictos que respiran el sulfato, contienen citocromos, lo que indica que la respiración anaerobia ligada al sulfato podría implicar la operación de una cadena de transporte de electrones análoga a la de la respiración aerobia. El citocromo C3, por ejemplo, es un transportador de electrones en la reducción del sulfito, tiosulfato y otros sustratos.

Respiración de sulfatos (géneros Desulfovibrio o Desulfotomaculum, Desulfobulbus, etc):

REDUCCION DESASIMILATORIA DE SULFATO:



Medio de Cultivo

Fosfato de potasio	0,1 g	Extracto de levadura	1,0 g
Cloruro de amonio	1,0 g	Cloruro de sodio	10,0 g
Sulfato de sodio	2,0 g	Agua dest.	1000 ml
Sulfato de magnesio	0,2 g	Eh ^o inferior a -100 mV	
Cloruro de calcio	0,06 g	pH	7.3 +/- 0.3
Sulfato ferroso	0,004 g	Atmósfera libre de oxígeno	

Se distribuye 9 ml en frascos de 10 ml de capacidad nominal, con tapón de goma y precinto. Se esteriliza, se inocula 0.5 ml de un cultivo de 24 hs.

Interpretación de Resultados

Ennegrecimiento del medio	Positivo
No hay cambio en el medio	Negativo

Imagen 9. Bacterias sulfato-reductoras (izq).

Microorganismo	Resultado
<i>Desulfovibrio</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	-



ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE LOS HIDRATOS DE CARBONO

UTILIZACIÓN DE AZÚCARES COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO:

Para probar la utilización de un hidrato de carbono (mono o disacárido) se utiliza el siguiente medio basal:

Medio de Cultivo	
CINH ₄ .	1,0 g
PO ₄ HK ₂	1,0 g
Sulfato de magnesio	0,25 g
Extracto de levadura	0,025 g
Citrato férrico amoniacal	0,05 g
Agua destilada	1000 ml

A este medio basal se le adiciona 4 g/l del azúcar ensayado que será usado como fuente de carbono y energía.

Interpretación de resultados:

<i>Ázúcar</i>	<i>Crecimiento</i>	<i>Resultado</i>	<i>Microorganismo</i>
<i>D-Ribosa</i>	<i>Turbidez +</i>	<i>+</i>	<i>P.aeruginosa</i>
<i>Lactosa</i>	<i>Turbidez -</i>	<i>-</i>	<i>P.aeruginosa</i>

HIDRÓLISIS DE POLISACÁRIDOS

HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN:

OBJETIVO:

Determinar la capacidad de un organismo para hidrolizar el almidón por acción enzimática.

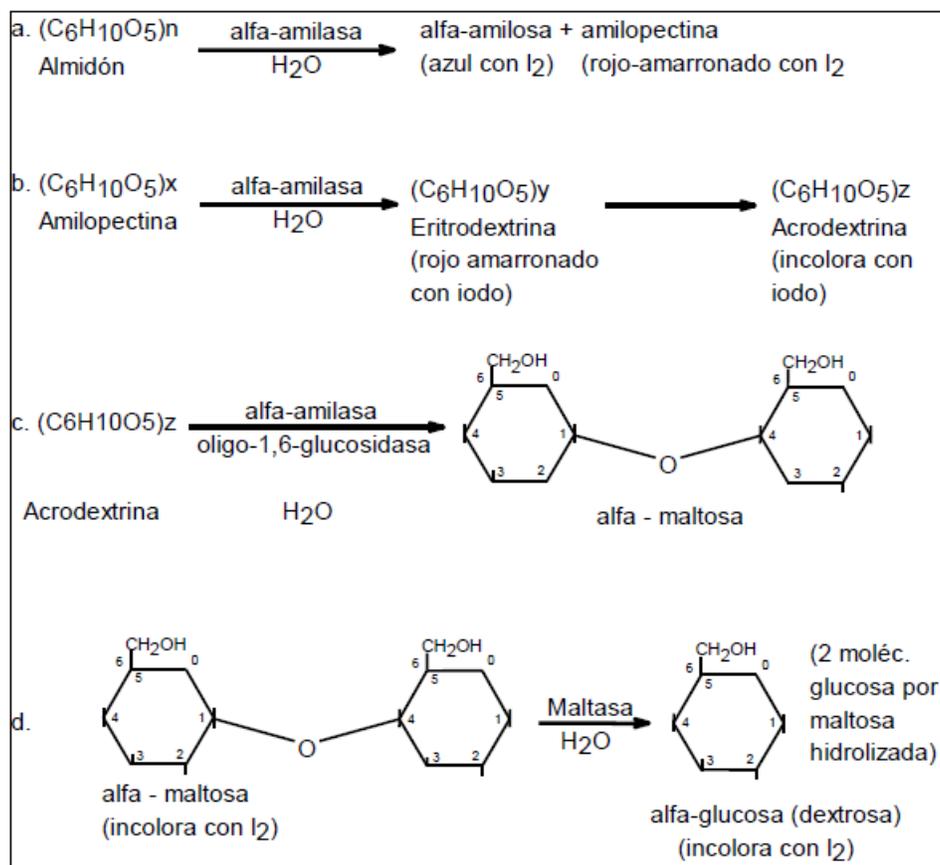
Bases Bioquímicas:

El almidón es un homopolisacárido, formado por muchos monómeros de alfa-Dglucosa.

La estructura básica del almidón es una mezcla de 2 moléculas de polisacáridos poliglucosa: la amilosa que es lineal y forma una estructura helicoidal enrollada, que es la responsable del color azul que se produce frente al reactivo iodado, forma entre

un 10 a un 20 % del almidón. La otra molécula es la amilopectina que es mayor que la amilosa y esta muy ramificada, se encuentra entre un 80 a un 90%.

La hidrólisis de la amilopectina produce dextrinas que conforman una serie de moléculas de almidón parcialmente digeridas, son moléculas grandes que constan de un número pequeño de polímeros de glucosa. Las dextrinas sufren degradación más o menos completa a maltosa y a una pequeña cantidad de glucosa.



Medio de Cultivo

Peptona	5,0 g
Extracto de carne	3,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000 ml

Pesar las cantidades y disolverlas en 500 ml de agua destilada. Calentar hasta disolución. Agregar al medio 1% de almidón soluble disuelto en 250 ml de agua destilada. Mezclar todo y llevar a 1000 ml. No debe hervir en exceso, ya que el sobre calentamiento puede hidrolizar al almidón.

Se distribuye en placas y se siembra en estrías un cultivo puro de 18-24 hs.

Reactivo:

Se utiliza la solución iodada del Gram. Se adiciona unas gotas de solución iodada sobre la siembra cultivada en el medio base de almidón.

La amilosa y la amilopectina se comportan diferentes frente al Iodo. La amilosa se combina más fuertemente con el Iodo que la amilopectina y produce un color azul intenso. El color puede variar hacia el púrpura y al incoloro si el almidón ha sido hidrolizado.

La amilopectina da un color rojo con el Iodo ya que no se une efectivamente y puede virar hacia el incoloro si se encuentran presentes acrodextrinas.

Interpretación de los resultados y control de calidad:

Azúcar	Resultado	Microorganismo
Medio púrpura-azul con área incolora (zona de hidrólisis) alrededor del crecimiento.	+	<i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>B.stearotermophilus</i>
Medio púrpura-azul.	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

DISACÁRIDOS: PRUEBA DE LA β-GALACTOSIDASA (ONPG):

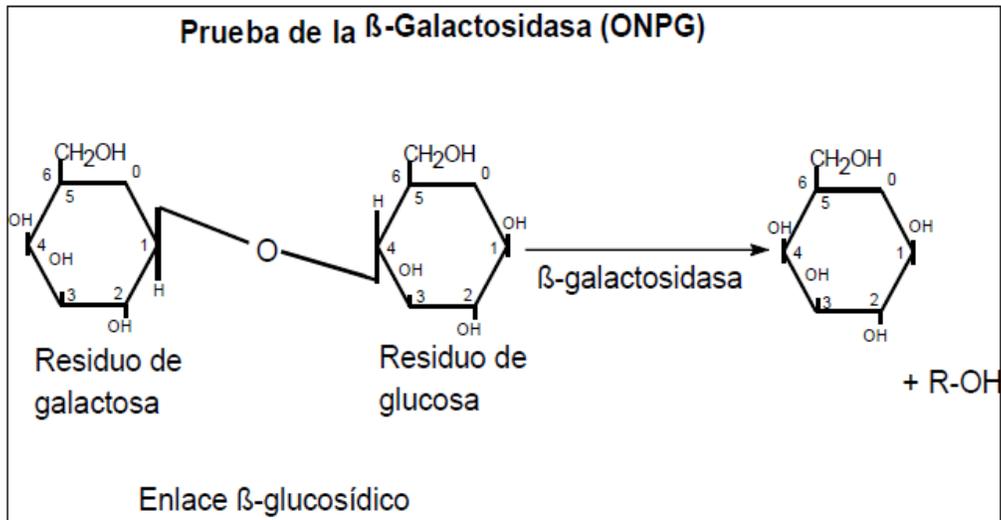
OBJETIVO:

Demostrar la presencia o ausencia de la enzima β-galactosidasa, utilizando el compuesto orgánico O-nitrofenil-β-D-galacto piranósido (ONPG), diferenciando así los organismos con reacción retardada para la utilización de la lactosa de microorganismos lactosa negativos.

Bases Bioquímicas:

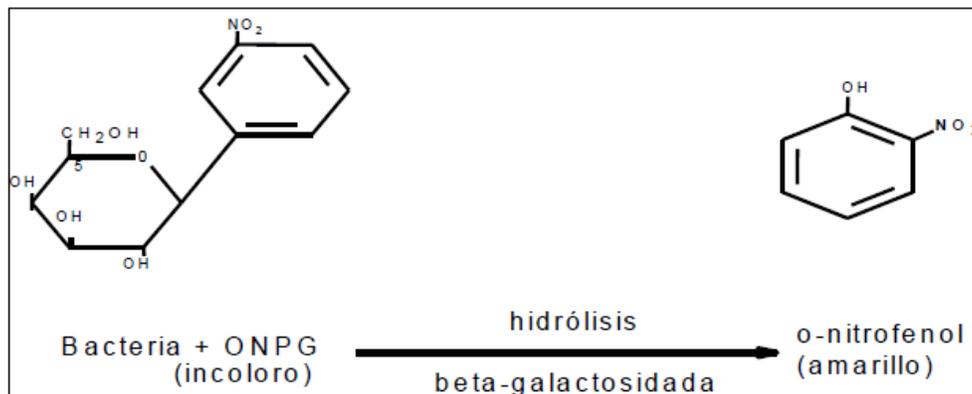
Los organismos que fermentan la lactosa en forma activa poseen dos enzimas inducidas: la β-galactosidasa-permeasa y la β-D-galactosidasa.

Antes de que el sustrato lactosa pueda ser metabolizado por un organismo debe penetrar en la pared de la célula. La enzima β-galactosidasa-permeasa está localizada en la membrana celular y se halla vinculada con el transporte de la lactosa y con la acumulación de la misma dentro de la célula, donde es catalizada por la enzima β-D-galactosidasa. Esta última es una enzima intracelular vinculada con la hidrólisis de la lactosa (en galactosa y D-glucosa), y de otros beta-galactósidos. La enzima actúa sobre la molécula de lactosa y rompe entre el C1 de la galactosa y el oxígeno.



Existen microorganismos que producen fermentación retardada de la lactosa que carecen de la enzima beta-galactosidasa permeasa, pero sí pueden fermentar la lactosa ya que producen la enzima intracelular necesaria para metabolizarla.

Se puede evidenciar la presencia de la β -D-galactosidasa empleando el compuesto orgánico o-nitrofenol- β -D-galactopiranosido (ONPG) que es incoloro en condiciones ácidas y se hidroliza por esta enzima produciendo un color amarillo en medio alcalino. El ONPG no necesita de la enzima permeasa para penetrar en el interior de las bacterias.



Preparación de los discos ONPG

ONPG	0,1 g
Agua	4 ml
Solución tampón	1 ml
pH	7 - 7,5

Se utilizan discos de ONPG comerciales.

Reacción: 0.5 ml de solución fisiológica más una ansada de cultivo de 24-48 hs.
 Agregar el disco de ONPG.

Interpretación del resultado:

<i>Azúcar</i>	<i>Resultado</i>	<i>Microorganismo</i>
<i>Amarillo</i>	<i>+</i>	<i>Escherichia coli inactiva</i>
<i>Sin cambio</i>	<i>-</i>	<i>Shigella boydii</i>

ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE PROTEINAS Y AMINOÁCIDOS

UTILIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO:

Para probar la utilización de un aminoácido se usa el siguiente medio basal:

Medio de Cultivo	
CINH4	1,0 g
PO4HK2	1,0 g
Sulfato de magnesio	0,25 g
Extracto de levadura	0,025 g
Citrato férrico amoniacal	0,05 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

A este medio basal se le adiciona 4 g/l del aminoácido ensayado, que será usado como fuente de carbono y energía.

Interpretación de resultados:

<i>Aminoácidos</i>	<i>Interpretación</i>	<i>Resultado</i>	<i>Microorganismo</i>
<i>D-Alanina</i>	<i>Crecimiento</i>	<i>+</i>	<i>P.aeruginosa</i>
<i>Histidina</i>	<i>Sin crecimiento</i>	<i>-</i>	<i>P.stutzeri</i>

PRUEBA DE LA FENILALANINA:

OBJETIVO:

Determinar la capacidad de un microorganismo de desaminar la fenilalanina en ácido pirúvico por acción enzimática, con la consiguiente acidez resultante.

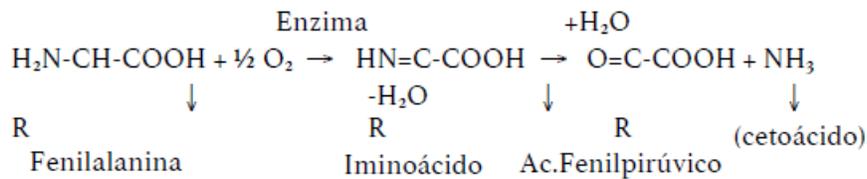
Bases Bioquímicas:

El aminoácido aromático fenilalanina sufre desaminación oxidativa catalizada por una flavoproteína (aminoácido oxidasa) para producir alfa-cetoácido y liberar amoníaco.

Este proceso se cumple en dos etapas:

- 1.- Es extraído de la fenilalanina dos H+, dando como producto, un iminoácido.
- 2.- El iminoácido es hidrolizado dando un cetoácido, que es el ácido fenil-pirúvico.

Desaminación de fenilalanina



Medio de Cultivo	
Extracto de levadura	3,0 g
D-L Fenil alanina	2,0 g
Fosfato disódico	1,0 g
ClNa	5,0 g
Agar	12 g
Agua destilada c.s.p	1000 ml

Solución acuosa de cloruro férrico al 10%:

Cloruro férrico (FeCl3) 10 g
 Agua destilada c.s.p.. 100 ml

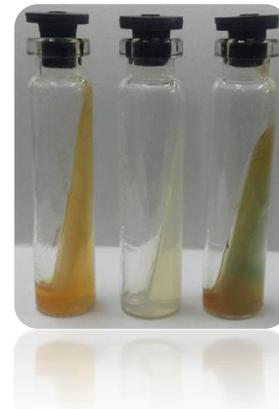
Esterilización: En autoclave 15 min. a 120°C. Se distribución en pico de flauta, se siembra por estría; incubación: 24 hs. a 37°C y atmósfera aeróbica.

Interpretación del resultado: Se Agregan 5 gotas de Cl3Fe al 10%, haciendo que el reactivo se deslice suavemente sobre el pico de flauta. Si hay formación de ácido fenil-pirúvico se observa color verde en la superficie en un tiempo de 2 a 5 minutos.

El Cl3Fe actúa como agente quelante con el ácido fenil-pirúvico formado dando un compuesto color verde.

Ej., Microorganismo	Resultado
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Proteus</i>	+

Imagen 10. Prueba fenil alanina negativo (izq.); medio sin sembrar (centro), positivo (der.)



PRUEBA DEL INDOL (Medio de cultivo SIM):

OBJETIVO:

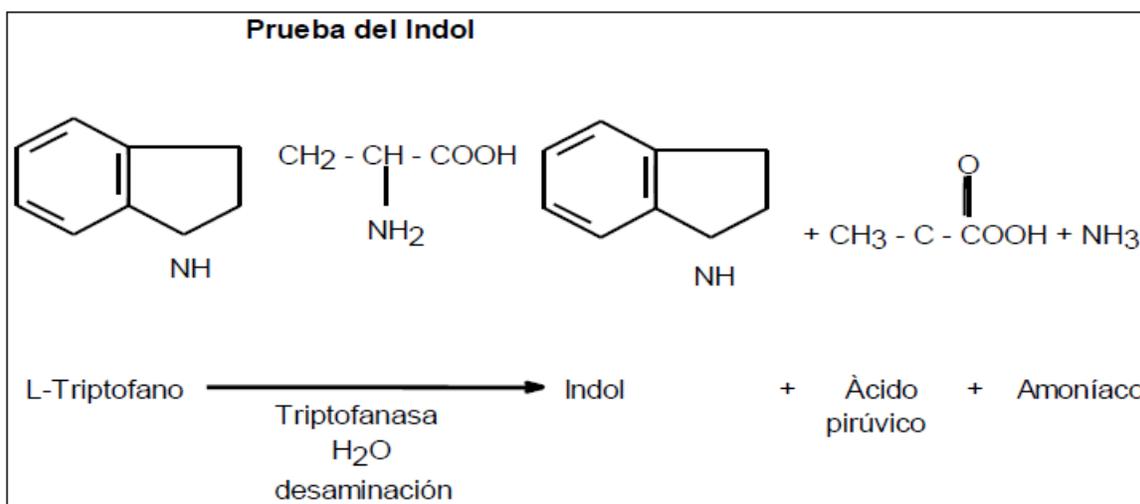
Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula triptófano..

Bases bioquímicas:

El triptofano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, metilindol e indolacético.

Diversas enzimas intracelulares que intervienen en este proceso reciben el nombre colectivo de "Triptofanasa". La enzima triptofanasa cataliza la reacción de desaminación, atacando la molécula de triptofano solamente en su cadena lateral y dejando intacto el anillo aromático en la forma de indol.

La desaminación del triptofano es del tipo reductor, el NH₂ es extraído y liberado como NH₃ y energía que es utilizado por la bacteria.



Medio de Cultivo	
Peptona de caseína	20 g
Peptona de carne	6,5 g
Citrato ferriamónico	0,2 g
Tiosulfato de Na	0,2 g
Agar	3 g
Agua destilada c.s.p	1000 ml
pH	7-7,5

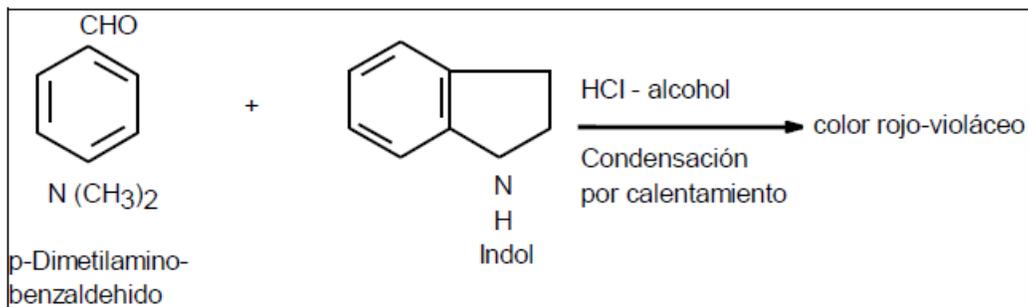
Se distribuye en tubos con 3 ml, en columna. Se siembra por punción.

Reactivo del Indol de Erlich:

p-dimetilamino-benzaldehído 2 g
 Alcohol etílico 190 ml
 HCl (concentrado) 40 ml

Disolver el aldehído en el alcohol y agregar lentamente el ácido a la mezcla aldehído-alcohol.

Cuando existe indol, éste se combina con el aldehído para dar un color rojo.



Agregar algunas gotas de reactivo directamente a un tubo sembrado incubado 24-48 hs a 37°C y observar la reacción.

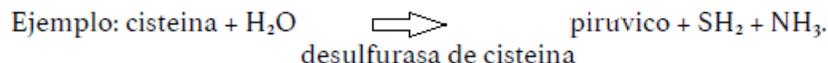
Interpretación del resultado:

Color	Resultado	Ej., Microorganismo
Un anillo rojo en la superficie del medio.	+	<i>Escherichia coli</i>
No hay cambio de coloración.	-	<i>Salmonella</i>

El medio SIM también sirve para **determinar movilidad y producción de sulfhídrico**, antes de adicionar el reactivo.

Movilidad: se observa por un crecimiento fuera de la zona de punción.

SH₂: algunas bacterias pueden liberar SH₂ de aminoácidos por acción enzimática.



El medio contiene citrato de ferriamónico que reacciona con el SH₂ para dar un precipitado negro.

Imagen 11. Diferentes resultados en Prueba de Indol.



DESCARBOXILACIÓN DE AMINO ÁCIDOS

MEDIO DE MOLLER:

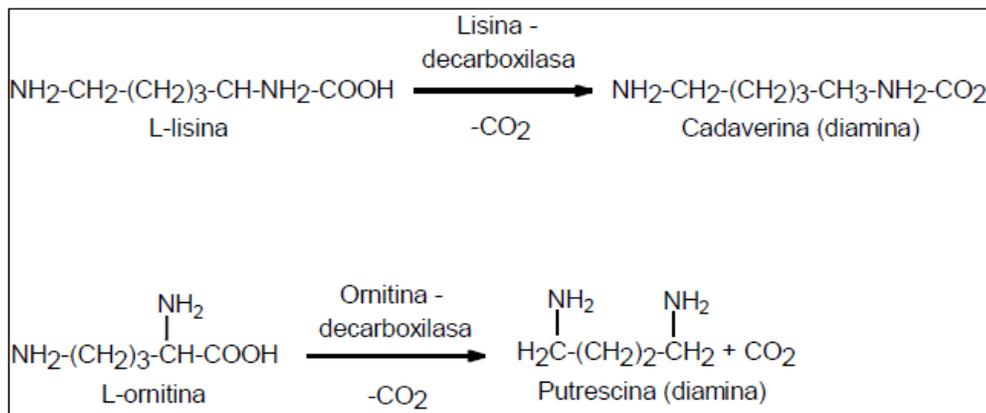
OBJETIVO:

Medir la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido.

Bases bioquímicas:

La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas, son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo (-COOH) dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico. Son enzimas adaptativas o inducidas. Es un proceso anaeróbico e irreversible.

Esta prueba sólo puede realizarse en cepas que fermentan la glucosa. Se cultiva la bacteria en un medio que contiene glucosa y en condiciones de anaerobiosis. La bacteria fermentará la glucosa disminuyendo el pH del medio permitiendo así que se desreprimen genes que codifican para la producción de carboxilasas. Los productos de la descarboxilación provocan una desviación del pH hacia la alcalinidad a medida que se produce CO₂.



Tanto la cadaverina como la putrescina son estables en condiciones anaeróbicas. El aminoácido L-arginina es catabolizado a través de dos sistemas: el sistema de la arginina-decarboxilasa y el de la arginina-dehidrolasa. En el sistema de la decarboxilasa la L-arginina sufre la decarboxilación para dar agmatina, la cual es desdoblada en urea y putrescina. Si se encuentra la enzima ureasa en el organismo, la urea es metabolizada en NH₃ y CO₂.

Medio de Cultivo (Caldo de Moller)

Peptona	5 g
Extracto de carne	5 g
Glucosa	0,5 g
Púrpura de bromocresol	0,1 g
Rojo de cresol	0,005 g
Piridoxal	5 g
Agua destilada	1000 ml

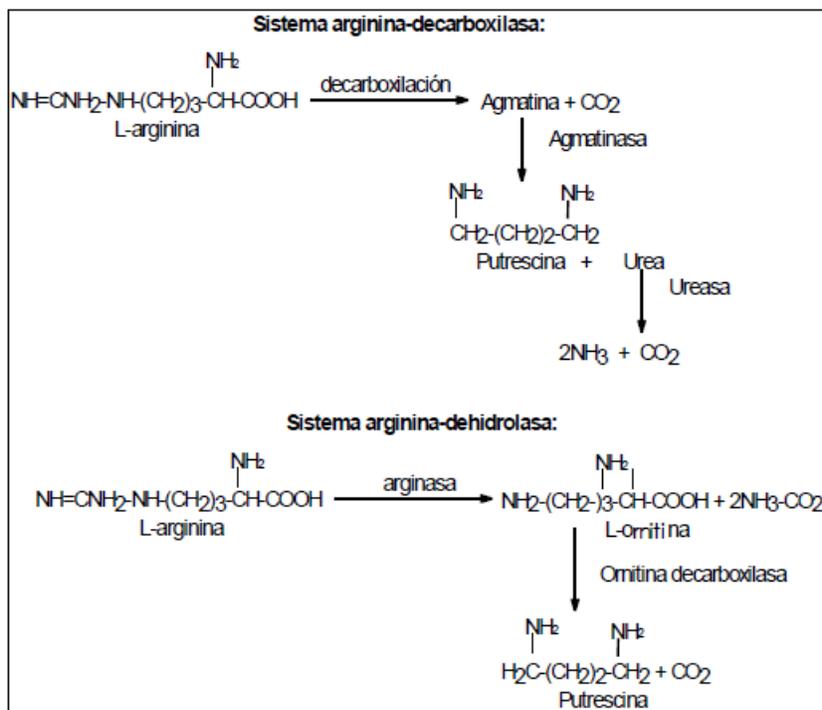
Indicadores de pH:

a)Purpura de bromo cresol

1. Ácido: color amarillo, pH:5,2
2. Alcalino: color púrpura, pH:6,8

b)Rojo cresol

1. Ácido: color amarillo, pH:7,2
2. Alcalino: color rojo, pH:8,3



Medio no inoculado:

1. pH: 6.
 2. Color púrpura intenso brillante.
- Agregar al medio 0,5% del aminoácido a ensayar antes de ser distribuido. Distribuir 3-5 ml en tubo.

Inoculación e incubación:

Inocular un cultivo puro de 18-24 hs y cubrir los tubos con unas gotas de vaselina. Incubar de 24 hs a 4 días a 37°C.

Interpretación de los resultados:

Resultado	pH	Coloración	Microorganismo
+	Alcalino	Púrpura turbio	Salmonella
-	Acido	Amarillo claro (por fermentación de la glucosa)	Citrobacter

AGAR LISINA HIERRO (LIA):

OBJETIVO:

Demostrar simultáneamente la presencia de la enzima lisina descarboxilasa (LDC) o lisina desaminasa (LDes.) y la producción de ác. Sulhídrico.

Bases bioquímicas:

La lisina es descarboxilada para formar la amina cadaverina, aumentando el pH del medio de cultivo. Esta reacción se lleva a cabo en medio ácido (pH inferior a 6).

El medio contiene glucosa para producir la acidificación (amarillo) en los microorganismos LDC positiva, y luego de actuar esta enzima vira nuevamente al color violeta.

Los microorganismos LDC negativos pero fermentadores de glucosa, producen viraje al amarillo de la totalidad del medio de cultivo. La incubación prolongada puede ocasionar una alcalinización en la zona de la superficie del medio de cultivo (por desaminación de peptonas) y en consecuencia se produce viraje al violeta.

Algunas bacterias desaminan la lisina a ácido alfa-cetocarbónico. Este último, con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno, forma combinaciones pardo-rojizas en la región superficial del medio de cultivo.

La producción de ácido sulfhídrico da coloración negra debida al sulfuro de hierro que se forma.

Observaciones: Este medio debe usarse con microorganismos que fermentan la glucosa.

Medio de Cultivo LIA

Peptona	5,0 g	Citrato férrico amónico	0,5 g
Extracto de levadura	3,0 g	Purpura de Bromo Cresol	0,02 g
Glucosa	1,0 g	Agar agar	12,5 g
Lisina monoclorhidrato	10,0 g	pH	6,7
Tiosulfato de Sodio	0,04 g		

Esterilizar el medio y fraccionarlo en tubos en forma de columna y pico de flauta. Sembrar un cultivo de 24 hs por estría y punción e incubar 24 - 48 hs a 37°C.

Interpretación de resultados:

<i>Resultado</i>	<i>Color.Pico</i>	<i>Color. Columna</i>	<i>SH₂</i>	<i>Microorganismo</i>
<i>LDC +</i>	<i>Violeta</i>	<i>Violeta</i>	<i>-</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>LDC -</i>	<i>Violeta</i>	<i>Amarillo</i>	<i>+</i>	<i>Citrobacter</i>
<i>LDes. +</i>	<i>Pardo-rojizo</i>	<i>Amarillo</i>	<i>+/-</i>	<i>Proteus</i>



Imagen 12. LDes. (izq); LDC negativo (centro); LDC positivo (der)

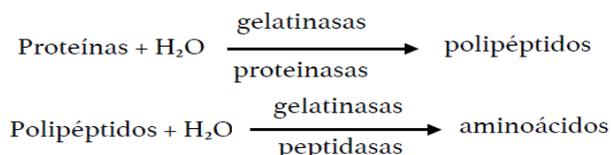
HIDRÓLISIS DE GELATINA:

OBJETIVO:

Determinar la capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licúen la gelatina.

Bases Bioquímicas:

Las proteínas que se producen naturalmente son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana; por lo tanto, para que una célula utilice las proteínas, primero deben ser catabolizadas en componentes más pequeños. Las enzimas exocelulares de tipo proteolítico, gelatinasas, son secretadas por ciertas bacterias para desdoblar a las proteínas y este proceso se realiza en dos etapas:



Medio de Cultivo	
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Gelatina	120 g
Agua destilada	1000 ml

El medio estéril se distribuye 3 a 4 ml en cada tubo en columna y se inocula por punción un cultivo de 24 hs. La incubación puede ser prolongada.

Interpretación de resultados:

Prueba positiva: Se licúa el medio. **Prueba negativa:** El medio permanece sólido

Microorganismo	Resultado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	-

Imagen 13. Gelatinasa positiva (izq), negativo (der).



HIDRÓLISIS DE CASEÍNA:

OBJETIVO:

Determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar la caseína.

Bases Bioquímicas:

La caseína es la proteína principal de la leche de mamíferos, es una fosfoproteína con propiedades ácidas, que es hidrolizada por diversas pepsinas. Es una proteína conjugada ya que por hidrólisis produce además de aminoácidos, un grupo prostético (porción no aminoácido de una proteína) formado por fosfato esterificado a restos de serina.

Medio de Cultivo-Agar Nutritivo	
Extracto de levadura	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Agregar 10ml de una solución al 10% de leche en polvo descremada estéril (autoclavada a ½ atm. durante 30') y enfriada a 50°C a 100 ml de Agar nutritivo.

Esterilizar el medio, distribuirlo en placas (una vez agregada la leche), sembrar un cultivo de 24 hs. e incubar hasta 14 días.

Interpretación de los resultados:

<i>Característica</i>	<i>Resultado</i>	<i>Ej., Microorganismo</i>
<i>Zonas claras alrededor del crecimiento.</i>	<i>+</i>	<i>Bacillus staerothermophilus</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>-</i>	<i>Escherichia coli</i>

Nota:

La producción de ácido de la lactosa en la leche inhibe la acción de enzimas proteolíticas, por lo tanto inhibe hidrólisis de caseína.

TEST DE LA COAGULASA:

OBJETIVO:

Comprobar la facultad de un organismo de coagular el plasma por secreción de la enzima coagulasa.

Bases Bioquímicas:

La coagulasa es una enzima proteica de composición química desconocida, capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina, provocando la formación de un coagulo visible en un sistema analítico adecuado. Se cree que la coagulasa funciona in vivo produciendo una barrera en el sitio de la infección estafilococica.

La coagulasa es una enzima proteica que se halla presente en dos formas, "libre" y "fija", cada una de las cuales posee diferentes propiedades que requieren el uso de técnicas separadas:

❖ Coagulasa fija (prueba en portaobjeto): Es conocida como "Factor de aglutinación", está unida a la pared celular bacteriana y no está presente en los filtrados de cultivos. Los hilos de fibrina formados entre las células bacterianas suspendidas en plasma (fibrinógeno) provocan su aglutinación, indicada por la presencia de agregados visibles en el portaobjeto. La actividad de la coagulasa fija no es inhibida por los anticuerpos formados contra la coagulasa libre.

❖ Coagulasa libre (prueba en tubos): Es una sustancia semejante a la trombina, que se halla en los filtrados de cultivos. Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se mezcla en partes iguales con una pequeña cantidad de plasma en un tubo de ensayo, se forma un coagulo visible como consecuencia de la utilización de los factores de coagulación del plasma de manera similar a cuando se añade trombina.

Reactivos: Plasma humano o de conejo estéril.

Técnica y descripción de la reacción:

Prueba en portaobjeto (coagulasa fija):

1. Colocar una gota de agua destilada o solución fisiológica estéril sobre un portaobjeto.
2. Emulsionar suavemente una suspensión del organismo en estudio en el agua, con ansa o varilla estéril.
3. Colocar una gota del plasma reconstituido junto a la gota de la suspensión bacteriana. Mezclarlas bien.
4. Inclinar el portaobjeto hacia uno y otro lado, observando la formación inmediata de un precipitado granular.

Prueba en tubos (coagulasa libre):

1. Colocar asépticamente 0,5 ml de plasma reconstituido en el tubo estéril.
2. Añadir 0,5 ml de cultivo puro de 18 a 24 hs. en caldo del microorganismo a estudiar.
3. Mezclar por rotación suave del tubo, evitando agitar el contenido.
4. Colocar el tubo en baño de agua a 37°C. Observar la formación de un coagulo visible.

Comentarios:

No se debe utilizar plasma citratado pues los microorganismos que utilizan citrato, como por ejemplo el *Streptococcus faecalis*, pueden dar una reacción falsa positiva.

Características	Resultado	Ej., Microorganismo
Coagulación del plasma.	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sin cambio.	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE LOS LÍPIDOS

PRUEBA DE LA LECITINASA:

(Manual Microbiología (pág.417))

OBJETIVO:

Determinar la presencia de lecitinasas en microorganismos.

Bases Bioquímicas:

Las lecitinas son sustancias cerasas, blancas, muy higroscópicas presentes en yema de huevo. Contienen un ácido graso no saturado y otro saturado. Son enzimas capaces de catalizar la liberación de los ácidos grasos de la molécula compleja de lecitina.

Medio de Cultivo			
Peptona	20 g	Glucosa	1 g
Na ₂ HPO ₄ . 2,5 g	2,5 g	Agar agar	12,5 g
ClNa	1,0 g	Agua destilada	500 ml
SO ₄ Mg, sc. 0,5%(P/V)	0,1 ml		

Se esteriliza el medio. Aparte desinfectar la superficie de un huevo con alcohol iodado, y dejar que se seque. Romper el huevo y separar la yema de la clara. Hacer una solución con la yema al 50% en solución fisiológica y adicionarla al agar fundido y enfriado a 60°C para lograr una concentración del 5%.

Se reparte en placas y se siembra por estrías. Se incuba a 37°C de 24 a 48 hs.

Interpretación de Resultados

Zonas opacas en el medio, alrededor de la colonia (producto insoluble de la degradación de lecitinas). Positivo

No hay cambio en el medio Negativo

Color	Resultado	Ej. Microorganismo
Productos insolubles, ópacos alrededor de la colonia.	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
-	-	<i>Escherichia coli</i>

HIDRÓLISIS DE TWEEN 80:

Bases Bioquímicas:

Esta reacción indica la actividad lipolítica de una bacteria mediante el uso del Tween 80 (éster del ácido oléico).

Medio de Cultivo	
ClNa	5,0 g
Peptona	10,0 g
Cl ₂ Ca	0,1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Reactivo:

El Tween 80 es esterilizado separadamente en autoclave, adicionando luego al medio base para dar una concentración final del 1%. Se distribuye en placas y se siembra por estría.

Interpretación del resultado:

Las placas son observadas diariamente, hasta 10 días de incubación, para detectar zonas opacas alrededor de la siembra que se deben a la formación de cristales de jabones de Calcio que pueden observarse bajo la lupa. A los diez días se remueve la siembra para observar la presencia de precipitado bajo la misma.

Características	Resultado	Ej Microorganismo
Formación de cristales alrededor o debajo de la colonia.	+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
-	-	<i>Pseudomonas pútida</i>

ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE EL DNA

Técnica:

El DNA en medio ácido precipita, cuando la bacteria produce la enzima DNAsa, se hidroliza el DNA, observándose por adición de una solución de ClH una zona clara alrededor de la colonia.

Medio de Cultivo	
Bacto-Triptosa	20 g
DNA	2 g
ClNa	5 g
Bacto Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH final	7,3

Se reparte en placas, se las seca y se las siembra por estrías. Después de incubar a 37°C durante 18-24 hs. se cubre el medio con solución de ácido clorhídrico 1 N.

Interpretación del resultado:

La prueba positiva se observa por la presencia de una zona transparente alrededor de la colonia.

Microorganismo	Resultado
<i>Staphylococcus aureus</i>	+

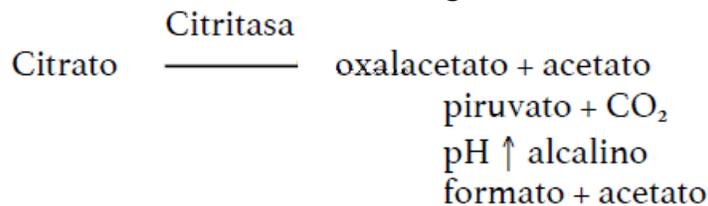
UTILIZACIÓN DEL CITRATO:

OBJETIVO:

Determinar si un organismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para su metabolismo, provocando alcalinidad.

Bases Bioquímicas:

En la mayoría de las bacterias el metabolismo del citrato es rápido a través del ciclo del ácido tricarboxílico o el ciclo de la fermentación del citrato. El desdoblamiento del citrato comprende el sistema enzimático de la citritasa (citrato oxalacetato-liasa) o citrato desmolasa. La enzima requiere de un catión bivalente para activarse, se utiliza el magnesio incluido al medio como sulfato de magnesio.



Los organismos capaces de usar citrato como única fuente de carbono utilizan también las sales de amonio como única fuente de nitrógeno. Estas sales se desdoblán en NH₃, dando alcalinidad, virando el indicador (azul de bromotimol) hacia el azul.

La degradación del piruvato, formado a partir del oxalacetato, depende del pH del medio. En medio alcalino se degrada a formato y acetato.

Medio de Cultivo			
Sulfato de magnesio	0,2 g	ClNa	5,0 g
Monofosfato de amonio (PO ₄ H ₂)NH ₄	1,0 g	Agar agar	15,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g	Azul de bromotimol (Sc. Alcohólica al 1,5%)	0,08 g
Citrato de sodio	2,0 g	Agua destilada	1000 ml

El medio una vez esterilizado, se lo fracciona en tubos en pico de flauta. Se siembra el medio por estrías, utilizando una cepa de 18-24 hs. Se incuba a 37°C durante 24 a 48 hs.

Interpretación del resultado:

<i>Características</i>	<i>Resultado</i>	<i>Ej. Microorganismo</i>
<i>Coloración azul con crecimiento.</i>	+	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Coloración verde sin crecimiento.</i>	-	<i>Escherichia coli</i>



Imagen 14. Citrato positivo (izq), negativo (der).

HIDRÓLISIS DE LA UREA:

OBJETIVO:

Determinar la presencia de la enzima ureasa en los microorganismos.

Bases Bioquímicas:

La urea es hidrolizada por la enzima ureasa, produciendo CO₂ y NH₃. Este último da reacción alcalina al medio, como puede comprobarse por el viraje del indicador (rojo fenol) de amarillo a fucsia.

Medio de Cultivo			
Peptona de carne	1,0 g	Rojo fenol	0,012 g
Glucosa	1,0 g	Agar agar	12,0 g
ClNa	5,0 g	Agua destilada	1000 ml
PO4H2K	2,0 g		

Una vez esterilizado el medio, se enfría a 45°C, se agregan 50 ml de una solución de urea estéril al 40% y se distribuye en tubos en forma de pico de flauta. Se siembra un cultivo de 24 hs estriando sobre la superficie del medio y se incuba a 37°C durante 24-48 hs.

Interpretación de Resultados	
Rosa o fucsia fuerte	Positivo
Amarillo	Negativo

Características	Resultado	Microorganismo
Coloración fucsia del medio.	+	<i>Proteus</i>
Coloración del medio original (naranja claro).	-	<i>Escherichia coli</i>

Imagen 15. Urea positivo (izq), negativo (der).



IDENTIFICACION:

Solo se puede identificar correctamente lo que ha sido previamente clasificado.

En microbiología, clasificar es ubicar una bacteria aislada dentro de una clasificación.

La identificación bacteriana y micótica es una actividad importante en el laboratorio

de microbiología. Demanda tiempo, dedicación y conocimientos teóricos claros y profundos en aspectos microscópicos, metabólicos, fisiológicos, ecológicos y genéticos.

La iniciación de identificación requiere como pasos obligatorios previos, **la obtención de cultivos puros y estandarizados**, entendidos como tal un cultivo previo en un medio nutritivo estandarizado por periodos previamente establecidos.

El procedimiento de identificación exige una técnica microbiológica depurada con las más altas exigencias en cuanto a evitar contaminaciones y errores en la rotulación de las cepas y medios de cultivo e identificación. Para poder efectuar una identificación tenemos que tener una clasificación previa de los microorganismos que nos permita asignarle un nombre que nos permitirá conocer a posteriori otras características de él.

Hay diferentes técnicas de identificación:

- Métodos fenéticos
- Métodos químicos
- Métodos genéticos

Métodos fenéticos o fenotípicos

Están influenciados por la transferencia horizontal de genes. La identificación bacteriana se realiza en la gran mayoría de los casos por medio de métodos tradicionales basados en características fenéticas. Estas son relativamente económicas, prácticas para trabajos de rutina, y en general satisfacen los estándares de calidad de identificación.

Se fundamentan en las propiedades que presentan las bacterias, como su morfología y características de tinción, desarrollo en diferentes medios de cultivo, morfología de las colonias, propiedades bioquímicas y metabólicas, y cuando están disponibles condiciones ambientales y ecológicas.

En el proceso de identificación bacteriana fenotípica, la experiencia es importante para determinar el medio de cultivo para confirmar la pureza de la cepa y las determinaciones a efectuar en forma conjunta o secuencial, en función del margen de

error de cada una de ellas y del género o especie bacteriana que se espera encontrar teniendo en cuenta el origen del que proviene.

Incluyen determinaciones de: **Morfología / Coloración / Cultivo / Reacciones metabólico-fisiológicas / Determinaciones inmunológicas.**

Las identificaciones genéticas son suficientes y cubren la mayoría de las identificaciones prácticas.

Métodos químicos

Clasificaciones basadas en la composición química de las bacterias. Están influenciados por la transferencia horizontal de género.

Métodos basados en proteica

La proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). Las técnicas de proteómica abordan el estudio de este conjunto de proteínas y las más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas.

Métodos basados en perfiles de ácidos grasos

Derivados de la hidrólisis de los fosfolípidos de membranas celulares de microorganismos se utilizan para estimar biomasa microbiana. Además, estos perfiles proveen información sobre la estructura taxonómica, diversidad funcional y estatus nutricional de comunidades microbianas. Por ejemplo, perfiles de ácidos grasos han sido usados para distinguir entre comunidades microbianas de suelos sujetos a diferentes tratamientos agrícolas. Finalmente, extracción y análisis de ácidos grasos de organismos puros cultivados bajo condiciones estándares proveen información suficiente para el reconocimiento e identificación a nivel de especies o subespecies.

Determinaciones a partir de espectros obtenidos en INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURRIER

Es un método que está en desarrollo preliminar

Métodos moleculares

La ausencia de identidad entre las características fenéticas determinadas y las codificadas en las tablas de identificación, implican que los métodos fenotípicos realicen una identificación probable y no definitiva. Para resolver estos problemas presentados por los sistemas de identificación se han impuesto a los métodos

genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos.

De la amplia variedad de genes que se utilizaron en los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos géneros y especies bacterianas, el análisis del ARNr 16S es el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa. Sin embargo, en otras circunstancias, la alta homología genética presente en determinados géneros bacterianos o un reciente cambio en su asignación taxonómica, no permite realizar con el ARNr 16S una identificación a nivel de especie o de géneros. En estos casos, podemos recurrir a otros genes.

ARNr 16S (*rrs*)

Es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o ADN ribosomal ARNr 16S (ADN 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. De distribución universal, componente crítico en la función celular, el ARNr 16S actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación, aproximadamente 1.500 pb.

ARNr 23S

Es una alternativa en los casos en los que la fracción 16s no proporciona resultados concluyentes. El costo y la dificultad técnica en la amplificación de fragmentos más grandes limitan su uso.

***rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa) 6**

La ARN polimerasa (RNAP) es una enzima imprescindible en el proceso de transcripción y tiene distribución universal en bacterias, se aplica como cronómetro molecular. Probablemente no esté sometido a transferencia horizontal genética.

***gyrB* (subunidad β de la ADN girasa)**

La subunidad β de la ADN girasa o topoisomerasa II y está implicado en la replicación del ADN bacteriano. De distribución universal, la presencia en monocopia de *gyrB* permite la discriminación e identificación de especies fuertemente relacionadas pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, y también enterobacterias, micobacterias y bacterias ácido lácticas⁷.

NECESIDAD DE CULTIVOS PUROS

En general las bacterias se identifican por sus características fenotípicas (METABÓLICAS, FISIOLÓGICAS, QUÍMICAS, ETC), casi nunca una bacteria se identifica por su morfología. Nunca deben identificarse bacterias ambientales con probes previo PCR, por los problemas de primers. Solo puede usarse en unos pocos casos en clínica. La selección de una colonia aislada a partir de una placa de petri, en un recuento, NO

ASEGURA LA PUREZA DEL CULTIVO, esto es especialmente cierto en medios selectivos por los microorganismos vivos no cultivables y la colonias inhibidas.

Para el aislamiento previo a la identificación debe usarse un medio no selectivo. Las células que producen gran cantidad de exopolisacáridos pueden incluir contaminantes en sus cápsulas o biopolímeros.

Criterios de pureza:

- ❖ Morfología de la colonia en aislamientos sucesivos
- ❖ Coloración de gram
- ❖ En ambos casos deben estandarizarse al máximo las condiciones de incubación y cultivo.

Ante fracasos en la identificación

- 1.- No desesperarse
- 2.- No pensar que encontramos una especie nueva
- 3.- Revisar:
 - ✓ Pureza del cultivo.
 - ✓ Que se efectuaron los test apropiados.
 - ✓ Que todos los métodos son fiables.
 - ✓ Que se usaron correctamente las claves.
- 4.- Las fallas más frecuentes en identificación son:
 - Coloración de Gram defectuosa
 - Defectuosa determinación de la forma
 - Fallas en la determinación de la movilidad

IDENTIFICACIÓN METABÓLICA DE BACTERIAS, UTILIZADO EN EL TRABAJO PRÁCTICO:

Claves dicotómicas (claves diagnósticas):

La identificación se hace de manera escalonada .Se avanza a lo largo de rutas que se ramifican progresivamente, dependiendo de las respuestas positivas o negativas a las pruebas. **UN ERROR en una prueba conduce al diagnóstico equivocado.**

Debe confirmarse con las tablas de reacciones que nos darán la certeza de la identificación de la cepa.

Tablas de reacciones

No tienen las desventajas de las claves dicotómicas y es menos probable que la presencia de algunos resultados aberrantes afecte de manera negativa al proceso de identificación. Implican mayor trabajo y costo en reactivos y tiempo.

En el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* se tiene en cuenta que no todos los miembros del taxón darán resultados uniformes.

Así, la presencia de pruebas “+” (corresponde a > 80-85% de respuestas afirmativas) o “-” (< 15 - 20% de respuestas afirmativas) indica que la mayoría de los cultivos aislados corresponden con estos resultados; “v” o “d” indican respuestas positivas variables, es decir, en el intervalo de 21 a 79%. En otras tablas las codificaciones se expresan directamente en porcentajes.

Cuando utilizamos **métodos numéricos** la codificación de los resultados se establece con valores 1 para las reacciones positivas, 0 para las negativas y 9 para las desconocidas o dudosas.

También puede determinarse por el **Método del bionúmero** en el que las reacciones se agrupan de a 3, asignándole a la positividad de la primera el valor 1, de la segunda el valor 2 y de la tercera el valor 4.

En el Trabajo práctico se utilizarán solo 18 reacciones que agruparon en 6 grupos de 3 reacciones, cada uno de esos grupos nos proporcionará un número de 6 dígitos de acuerdo a cuales han sido positivas. Ese número se busca en una tabla que nos indica que género y especie bacteriana es.

Ver anexos

TAXONOMÍA (LA CIENCIA DE LA CLASIFICACIÓN)

Para poder comprender la gran diversidad de organismos existentes es preciso agruparlos y organizar los grupos generales en una estructura jerárquica sin superposiciones. De eso se encarga la TAXONOMÍA, que es la ciencia de la clasificación biológica. La taxonomía en su sentido más amplio se descompone en tres partes independientes pero interrelacionadas:

- ❖ Clasificación
- ❖ Nomenclatura
- ❖ Identificación

La **clasificación** es la estructuración de los organismos en grupos o taxones en función de semejanzas mutuas o del parentesco evolutivo.

La **nomenclatura** es la rama de la taxonomía que se ocupa de la asignación de nombres a grupos taxonómicos de conformidad con normas publicadas.

La **identificación** constituye el lado práctico de la taxonomía que consiste en establecer que un organismo determinado pertenece a un taxón reconocido.

La taxonomía bacteriana posee diferentes enfoques:

- **Taxonomía clásica:** incluye características fenóticas (observables) coloraciones como Gram, Ziel-Neelsen cápsulas, esporas de cultivo, fisiológicas y metabólicas.
- **Taxonomía química:** incluye datos de composición química de pared celular, membranas
- **Taxonomía genética/evolución:** basada en genética bacteriana y cuando se aplica a RNA ribosoma 16S se puede determinar la evolución bacteriana.
- **Taxonomía polifásica:** Es la tendencia actual. Consenso en la integración de distintos tipos de caracteres
- **Fenotípicos:** clásicos (morfología, nutrición, etc)
- **Moleculares** (marcadores quimiotaxonómicos)
- **Perfil de proteínas totales y enzimas**
- **Filogenéticos:** basados en el gen del ARNr 16S
- **Genotípicos**

ORDENACION TAXONOMICA:

En la ordenación taxonómica de un grupo biológico, las distintas especies se van agrupando sucesivamente en una serie superior de categoría de orden, esta ordenación se denomina jerárquica debido a que cada categoría, en la serie descendente agrupo un número mayor de unidades taxonómicas, basándose cada vez en menor cantidad de propiedades compartidas. Comprende los rangos en que se agrupan los organismos, ellos son:

- División
- Clase
- Orden
- Familia
- Tribu
- Género
- Especie bacteriana: Es un conjunto de poblaciones clonales que presentan un elevado grado de similitud fenotípica entre sí y que a su vez difieren de otros conjuntos de poblaciones clonales.

Taxonomía numérica

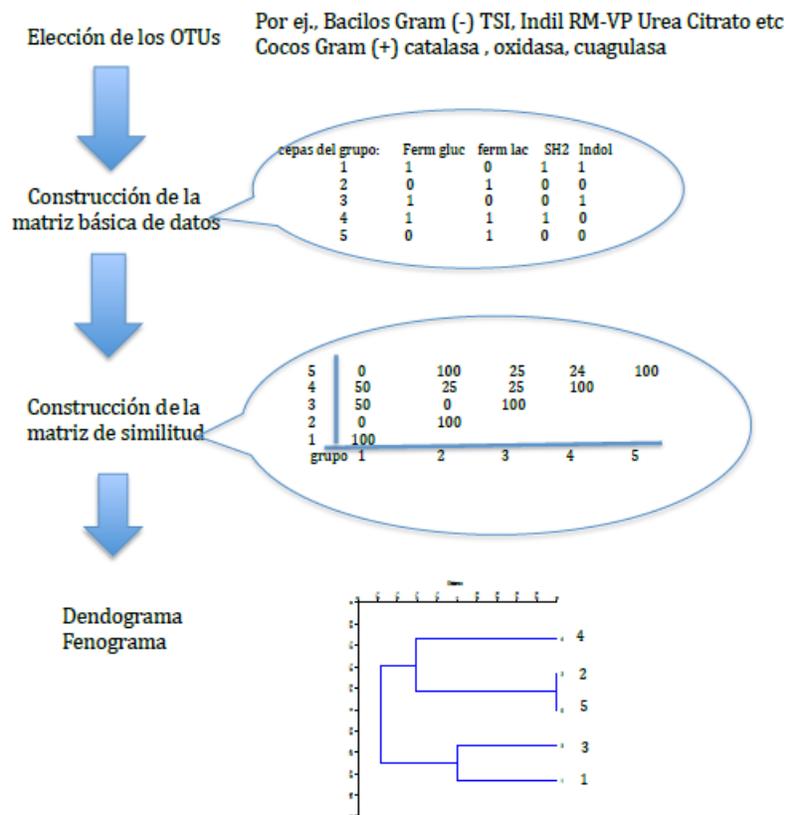
Es la agrupación de unidades taxonómicas por métodos numéricos, la cual ha alcanzado un importante crecimiento que ha permitido el uso de métodos estadísticos multivariados para la clasificación de los recursos genéticos (Sokal y Sneath, 1963).

Esta intenta cuantificar los datos y establecer grupos por la similitud global. Se anota el número de similitudes o características compartidas, y se agrupan en taxones más

cercanos aquellas especies con mayor número de similitudes, y en taxones más alejados a medida que el número de similitudes decrece.

En líneas generales, la taxonomía numérica intenta construir clasificaciones “naturales”, basadas en la semejanza fenotípica de los individuos (o de las clases), que se valora partiendo de una adecuada elección de un coeficiente de similaridad (Cuadras 1981).

En el análisis de agrupamiento se pueden definir un grupo de procedimientos básicos: análisis de datos, selección de variables, selección de una medida de proximidad a usar como índice de similaridad o disimilaridad entre los objetos, selección del procedimiento de agrupamiento, validación del agrupamiento obtenido y determinar el número conglomerados. Esta secuencia de análisis se puede realizar utilizando las facilidades que brinda un grupo de paquetes definidos en R, que es un lenguaje de programación principalmente orientado al análisis estadístico.



En la materia son ocho grupos, ahora la parte práctica de taxonomía es que cada grupo arme la matriz básica de datos, con los datos de todos los grupos, luego con la utilización de un programa estadístico PAS, realizar diagrama de claster o fenograma.

Ver las modificaciones que se producen con los cambios de agrupaciones que el programa posee.