

Capítulo 4

Metabolismo bacteriano

4.1 Medios de cultivo

4.1.1 Tipos de medios de cultivo, preparación y esterilización

Objetivos

- Adquirir habilidad para preparar, esterilizar y envasar un medio de cultivo.
- Reconocer la importancia de la selección y preparación adecuada de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento y cultivo de los microorganismos.

Introducción

Comercialmente se dispone de muchos medios de cultivo deshidratados, que son estables y se adaptan perfectamente a su empleo al laboratorio de diagnóstico. Los componentes habituales de los medios de cultivo son: extractos, peptonas, fluidos corporales (por ejemplo, sangre, suero), agar-agar, sistemas amortiguadores, indicadores de pH, agentes reductores y agentes selectivos (Parés & Juárez, 1996; Wheelis, 2008).

Tabla 3. Nutrientes en la naturaleza y en los medios de cultivo

	Forma habitual del nutriente en el ambiente		Forma química utilizada en medios de cultivo
Elemento aportado	Formas inorgánicas	Formas orgánicas	
Carbono (C)	-CO ₂ del aire. -CO ₃ ⁻² en rocas y sedimentos.	-Compuestos Orgánicos	-Glucosa, malato, acetato, piruvato. -Otros compuestos o mezclas: extractos de levadura, extractos de carne, peptona, triptona, caseína, gelatina
Nitrógeno (N)	-N ₂ del aire. -NH ₃ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , NH ₄ ⁺ en suelos y agua.	-Compuestos orgánicos nitrogenados	- <u>Inorgánicos:</u> NH ₃ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , NH ₄ Cl (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂ , - <u>Orgánicos:</u> aminoácidos bases nitrogenadas de nucleótidos. -Otros compuestos orgánicos que contienen mezclas: extractos de levadura, extractos de carne, peptona, triptona, caseína, gelatina
Oxígeno (O)	-O ₂ del aire. -Ciertos óxidos -Agua	-Compuestos orgánicos	-Agua -Compuestos orgánicos
Hidrógeno (H)	-Agua. -H ₂ como gas. -En depósitos minerales.	-Compuestos orgánicos	-Agua -Compuestos orgánicos
Fósforo (P)	-En depósitos minerales (PO ₄ ⁻³ , KH ₂ PO ₄)		-KH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄
Sulfuro (S)	-En depósitos minerales, sedimentos orgánicos (SO ₄ ⁻² , H ₂ S, S) -Sulfuros metálicos (FeS, CuS, ZnS, NiS, etc.)	-Compuestos Orgánicos azufrados	-Na ₂ SO ₄ -H ₂ S -Na ₂ S ₂ O ₃ -Na ₂ S
Magnesio (Mg)	-En depósitos minerales, sedimentos geológicos (MgSO ₄)		-MgCL ₂ . -MgSO ₄
Sodio (Na)	-En depósitos minerales, océanos (NaCL, NaSi)		-NaCl
Calcio (Ca)	-En depósitos minerales, océanos (CaCO ₃ , CaCL ₂)		-CaCL ₂
Hierro (fe)	-En depósitos minerales, sedimentos geológicos (FeSO ₄)		-FeCL ₃ -FeSO ₄ -Varias soluciones de Fe quelato con EDTA, citrato, etc.
Potasio (k)	-K ⁺ en solución o como sales		-KCl, -KH ₂ PO ₄

Tipos de medios de cultivo

Al preparar un medio de cultivo para un microorganismo cualquiera, el objetivo principal consiste en proporcionar una mezcla equilibrada de los nutrientes requeridos a concentraciones que permitan un buen crecimiento (Kruschwitz, 1990).

Por su origen

Medios sintéticos o definidos químicamente: estrictamente definidos desde el punto de vista de su composición química.

Medios naturales: son los preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal como extractos de tejidos o infusiones y cuya composición química no se conoce exactamente.

Por su función o aplicación

Medios comunes o universales: su finalidad es el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos cultivables del aire, suelo, agua, lo más utilizados son el agar o caldo nutritivo

Medios enriquecidos: están compuestos de un medio base como apoyo del crecimiento al cual se le puede agregar un gran exceso de nutrientes como suplementos nutritivos, por ejemplo: sangre, suero. Se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales. Son medios que sembrados con poblaciones mixtas de microorganismos, favorecen la multiplicación de ciertos grupos e inhiben el desarrollo de las especies restantes. Tienen las siguientes características:

- Suelen ser medios líquidos.
- Incluyen compuestos químicos específicos (sangre, suero o extracto de tejidos animales y de plantas) o requieren condiciones físicas especiales (temperatura, pH) que favorecen el desarrollo de un microorganismo determinado.
- Contienen sustancias que inhiben o destruyen la microbiota acompañante.
- El caldo de tetratiónato y el caldo de selenito son medios de enriquecimiento que se usan principalmente en bacteriología entérica.

Medios selectivos: son medios que permiten el crecimiento de un grupo de microorganismos e inhibiendo el de otros. La selectividad se logra alterando las condiciones físicas del medio de cultivo o agregando compuestos químicos inhibidores:

- Cambiando pH: para favorecer el desarrollo de *Lactobacillus*, se puede agregar ácido acético a los medios de cultivo para obtener un pH final de 5.4, totalmente inadecuado para muchas bacterias acompañantes.
- Altas concentraciones osmóticas: en agar manitol salado con una concentración de NaCl de 7.5 % muy pocas bacterias pueden crecer, salvo las que presenten una elevada tolerancia a NaCl, como *Staphylococcus aureus*.
- Agregando colorantes como verde brillante, cristal violeta, eosina, sales biliares para inhibir gérmenes Gram positivos, mientras que los Gram negativos se desarrollan sin dificultad.
- Agregando antibióticos: en biología molecular, al agregar ampicilina o tetraciclina en los medios de cultivo, se evidencia la presencia de bacterias genéticamente manipuladas. Estas células son resistentes a uno o más antibióticos y se pueden desarrollar en un medio que las incluye, mientras que las células acompañantes, sensibles a los antibióticos, no pueden crecer. En microbiología clínica se usan antibióticos de espectro de acción reducido, que inhiben o destruyen microorganismos cuyo estudio no interesa, a la vez que no afectan los microorganismos que se están investigando.

Medios diferenciales: permiten demostrar características metabólicas de un determinado grupo de microorganismos, se usa para diferenciar distinguir entre varios géneros y especies de microorganismos. Suelen ser a la vez selectivos.

Medios de prueba: son medios de composición conocida para el ensayo de vitaminas, aminoácidos y antibióticos.

Medios de mantenimiento: son medios que se utilizan para preservar satisfactoriamente las características fisiológicas y la viabilidad de un cultivo.

Medios para caracterización (pruebas bioquímicas): generalmente consisten en una base simple (nutricionalmente adecuada), a lo que se ha adicionado el sustrato que se va a probar, a veces con indicador, para mostrar que ha ocurrido un cambio en la reacción.

Medios reductores: contienen agentes reductores (ejemplo, tioglicolato de sodio, cisteína o glutatión). Se usa para el cultivo de microaerófilos y anaerobios.

Medios de transporte: son medios son utilizados para asegurar la viabilidad de la bacteria sin multiplicación significativa de los microorganismos desde el momento de su extracción hasta su posterior siembra en un medio de cultivo adecuado. Los medios de transporte más frecuentemente utilizados son los de Stuart, Amies y Carey - Blair.

Por la consistencia del medio

Sólidos: contienen agar.

Semisólidos: contienen pequeñas cantidades de agar (0.5 %).

Líquidos: son medios que no contienen agar.

Conservación y almacenamiento de los medios de cultivo deshidratados

- Deben ser lugares libres de humedad, polvo y radiación solar directa.
- Los recipientes deben mantenerse herméticamente cerrados.

Materiales

Balanza

Espátula

Pesasustancias

Medios de cultivo deshidratados

Erlenmeyer

Agua destilada

Estufa

Tubos de ensayo estériles

Cajas de Petri estériles

Autoclave

Pipetas de 10 ml estériles

Gradillas

Procedimientos

Preparación de los medios de cultivo

Para una buena preparación de los medios de cultivo es fundamental el empleo de instrumental de vidrio limpio, libre de detergentes.

Siempre que vaya a preparar un medio de cultivo, lea cuidadosamente las instrucciones que aparecen en el recipiente.

1. Pese la cantidad de medio, según la cantidad de cajas de Petri para preparar.
2. El volumen que se va a agregar en cada caja de Petri, es: para bacteria(15 ml) y para hongos(20 ml). Para tubos de 13x100 es de 5 ml, y para tubos 16x150 es de 12 ml.
3. Agregue el medio pesado a un erlenmeyer y adicione el volumen de agua(volumen de agua con respecto a gramos de medio para preparar).
4. Caliente hasta obtener una solución completamente transparente, agitándola constantemente para impedir que el medio se pegue en el fondo del recipiente. Este calentamiento se recomienda para medios líquidos, que usualmente se reparten en los tubos antes de llevarlos a esterilización.
5. La esterilización puede efectuarse de diferentes maneras: por calor, filtración o métodos químicos. El método de elección dependerá del medio, su consistencia y sus componentes lábiles.
6. Generalmente en la esterilización de los medios de cultivos se emplea el calor húmedo (autoclave) con preferencia al calor seco.
7. Llevar el erlenmeyer (previamente tapado con algodón y papel Kraft y marcado) al autoclave.

Si el medio se va a utilizar en tubos, es más práctico servirlo antes de ponerlo en autoclave.

Esterilización en el autoclave

El autoclave es un aparato similar a una olla a presión especial. El desarrollo del autoclave por Chamberland, en 1884, estimuló enormemente el progreso de la microbiología.

Para verificar que la esterilización en el autoclave fue efectiva, se suele incluir, durante el proceso un indicador biológico junto con el resto del material. Este indicador consiste normalmente de una ampolla estéril con un medio y una tira de papel cubierta de esporas de *Bacillus stearothermophilus* o *Clostridium* PA3679. Después de la esterilización en el autoclave, se rompe asépticamente la ampolla y el cultivo se incuba durante varios días. Si la bacteria indicadora no crece en el medio, los materiales han quedado esterilizados. A veces, se introduce también en el autoclave una cinta especial con la palabra *estéril* escrita o una tira de papel indicador que cambia de color después de un tratamiento suficiente con calor. Si la palabra aparece en la cinta o si el color cambia después del tratamiento, se supone que el material es estéril. Reconozca inicialmente las partes del autoclave en la Figura 20:



Figura 20. Autoclave.

Fuente: manual del equipo marca All-American® del Laboratorio del Grupo de Investigación Biología Ambiental UPTC

1. Verifique el nivel del agua de la cámara de vapor.
2. Coloque el recipiente de aluminio dentro de la cámara de vapor.

3. Introduzca el material que se va a esterilizar. Coloque en uno o dos de los materiales para esterilizar un pedazo de cinta control de esterilización.
4. Coloque la tapa, teniendo presente que la flecha que se encuentra en el borde de la tapa coincida con la ranura que está en el borde externo y además que la manguera del manómetro y conductora del vapor que está en la tapa, encaje en la canal del recipiente de aluminio.
5. Ajustar las llaves que están en la tapa, por parejas, tomando una frente a la otra, para ejercer la misma fuerza y así permitir un cierre nivelado de la tapa, evitando que se escape vapor y, por consiguiente, el fracaso, del método de esterilización.
6. Aplicar calor al autoclave, ya sea por medio de la estufa o de electricidad. En los primeros 10 a 15 minutos **la válvula de salida de vapor debe estar cerrada**, con el fin de calentar el autoclave, posteriormente la válvula de salida de vapor se abre y debe permanecer así hasta cuando el vapor desaloje el aire, lo cual se percibe cuando se produce un chorro continuo de vapor a través de la válvula.
7. Cerrar la válvula para permitir la concentración de vapor y el consecuente aumento de la temperatura y la presión, factores que deben ser controlados por medio del manómetro, que se encuentra ubicado sobre la tapa del autoclave.
8. Tenga en cuenta las condiciones establecidas que garantizan una verdadera esterilización:

Tiempo: 15-30 minutos

Presión de vapor: 15 libras/pulgadas cuadradas (lb/in²) o 1.1 kg/centímetro cuadrado (kg/cm²) o 1.2 atmósfera

Temperatura: 121 °C (249,8 °F)

9. Cumplido el tiempo de esterilización, se deja enfriar el autoclave hasta cuando la aguja del manómetro descienda a cero.

Precaución: abrir la válvula de escape después de que la aguja del manómetro esté en cero, para evitar quemaduras graves y derrame de medios dentro del autoclave.

Envase de los medios de cultivo (asegurar condiciones de completa esterilidad)

- Lleve el medio al baño de María (que se debe tener a una temperatura de 42 °C).

- Servir 15 ml (medios para bacterias) o 20 ml (para hongos) en las cajas de Petri previamente estériles y dejar solidificar.

Conservación de los medios de cultivo preparados (cajas de Petri o tubos)

- Las cajas de Petri o tubos se guardaran en el refrigerador para evitar su deterioro y su deshidratación. Se recomienda guardar los medios dentro de bolsas de plástico selladas. Según el medio de cultivo de que se trate y del hecho de que esté preparado en placas o tubos, guardados en bolsas es posible conservarlos entre 2 semanas y 4 meses.
- Antes de su uso deben colocarse a temperatura ambiente.

Prueba de esterilidad

Si no se utiliza un indicador de esterilización, se debe llevar uno o dos tubos o cajas de Petri a la incubadora durante 12 a 24 horas a 37 °C, (medios de cultivo para bacterias) y a 25 °C por 5 días (medios de cultivos para hongos). Observe después de la incubación si ha habido crecimiento microbiano. En caso de presentarse crecimiento, es indicativo de una mala esterilización y por lo tanto debe repetirse todo el procedimiento de preparación.

Prueba de efectividad

Para comprobar que en el medio preparado efectivamente se desarrollan microorganismos, se usa el medio de cultivo (ya sea exponiéndolo al ambiente o sembrando cualquier tipo de muestra).

Esterilización de material de vidrio

Placas de Petri: se preparan en paquetes de 8 a 10 placas según el tamaño, envolviéndolas con papel Kraf.

Tubos: se tapa cada uno con un tapón de algodón y se envuelven con papel en paquetes **Pipetas:** se coloca un algodón en la parte superior de la pipeta y se envuelve con papel. Todos estos materiales se esterilizan en horno a 160 (2 h) o a 180 °C (1 h).

4.2 Métodos para obtener cultivos puros: tipos de siembra

Objetivo

Practicar las diferentes formas de siembra.

Introducción

En el ambiente, y en general sobre cada sustrato, se encuentran mezclas de microorganismos, que al ser aislados en medios de cultivo sólidos en el laboratorio, se obtiene un cultivo mixto. A partir de estos, se deben realizar diferentes tipos de siembras, dependiendo del microorganismo, para obtener cultivos puros.

Los cultivos puros son fundamentales para los siguientes estudios:

- Características de las colonias (morfología, reacciones de coloración).
- Propiedades bioquímicas.
- Susceptibilidad de una especie determinada a los agentes antimicrobianos.
- Reacciones inmunológicas.

Siembra

La inoculación de los microorganismos presentes en una muestra, a un medio de cultivo, se denomina *siembra*. Las siembras se practican por medio de un escobillón, de asa bacteriológica o de pipeta. La transferencia de un cultivo a otro se denomina *subcultivo* o comúnmente, *repique*.

Tipos de siembra

Siembra en caja de Petri por agotamiento o estrías: este tipo de siembra, si se ha efectuado correctamente, constituye quizás el método más práctico y más útil para la obtención de colonias separadas (Figura 21).

1. Divida la caja en cuatro partes con un marcador. Tome el inóculo con el asa bacteriológica y trace estrías en el primer cuarto de la placa del medio de cultivo (Figura 21 a).
2. Se esteriliza el asa, se enfría en un borde de la caja y se hace girar la caja, se trazan estrías en el segundo cuarto de la placa (Figura 21 b).
3. Nuevamente se esteriliza el asa, se enfría en un borde de la caja y se hace girar la caja y continuar la estriación en el tercer cuarto de la placa (Figura 21 c).

4. Se esteriliza nuevamente el asa (enfriar el asa), y se hace girar la caja, se trazan estrías perpendiculares a las anteriormente practicadas en el cuadrante libre (Figura 21 d).
5. Al terminar el procedimiento se esteriliza el asa.
6. Llevar la caja de Petri a incubación.

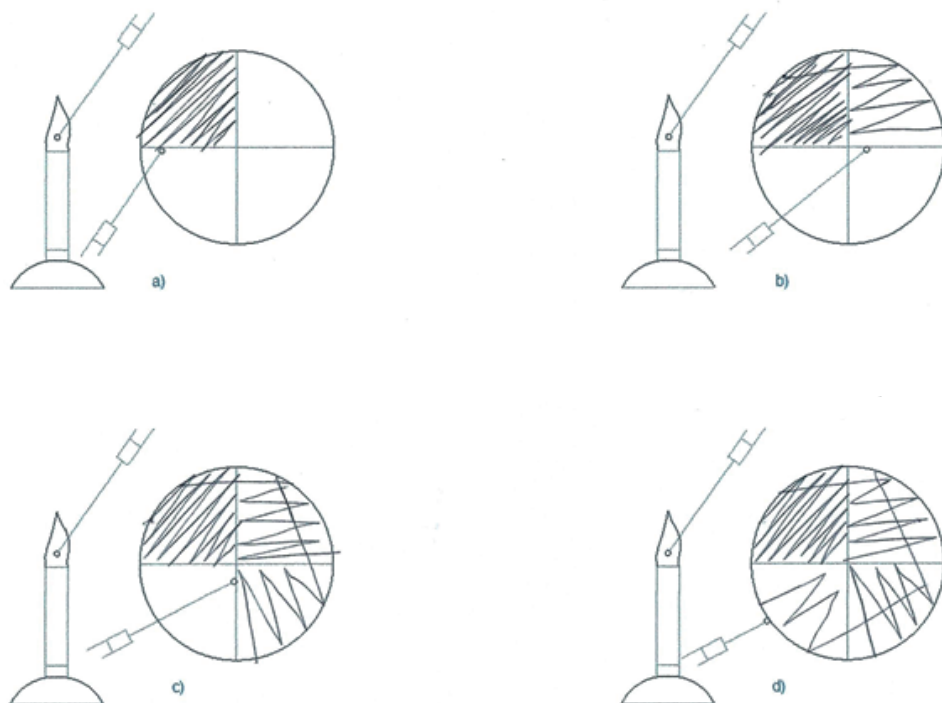


Figura 21 a, b, c, d. Técnica de siembra por agotamiento o estría.

Fuente: Aura Lizarazo Forero

Siembra en caja de Petri por sedimentación: consiste en abrir el medio de cultivo en el ambiente durante 15 minutos.

Siembra en caja de Petri con la técnica de siembra masiva: esta siembra se realiza con escobillón, sobre la superficie de un medio de cultivo sólido.

1. Humedezca un escobillón estéril dentro del medio líquido bacteriano, retire el exceso del inóculo realizando una ligera presión en las paredes del tubo.
2. Pintando en forma horizontal y vertical toda la superficie de la caja de Petri

Siembra en tubos:

Siembra en estría (medio sólido inclinado en bisel o pico de flauta).

Siembra mixta (medio sólido con siembra en picadura y estría).

Siembra en picadura (medio sólido o semisólido sin inclinar).

Siembra en tubo:

1. Flamee el asa bacteriológica.
2. Enfríe el asa en el fondo del tubo. Tape el tubo.
3. Tome con el asa una colonia a partir de sus placas de medio de cultivo.
4. Destape nuevamente el tubo estéril.
5. Introduzca el asa y coloque el inóculo según el tipo de siembra en tubo que desee realizar (Figura 22).
6. Al terminar el anterior procedimiento, esterilice el asa.

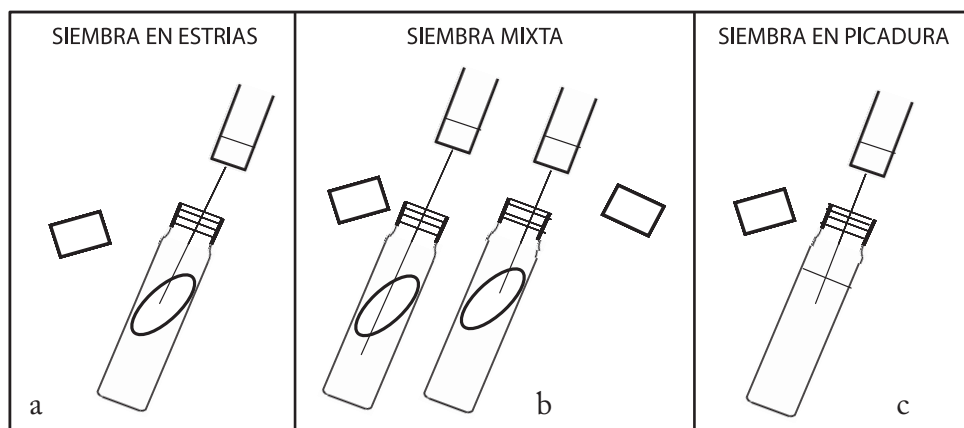


Figura 22. Tipos de siembra en tubo. a. siembra en estría, b. Siembra mixta. c. Siembra en picadura

Fuente: Aura Lizarazo Forero

Materiales

Cajas de Petri con agar nutritivo estériles

Asas bacteriológicas

Gradillas

Mecheros

Procedimiento

1. Siembre en las cajas de Petri, según la manera indicada en la introducción.
2. La superficie del agar del medio de cultivo por inocular debe hallarse libre de gotas de líquido de condensación antes de efectuar la estriación.

4.3 Medios selectivos y diferenciales

Objetivo

Familiarizarse con el uso y función de medios especializados para la selección y diferenciación de microorganismos.

Introducción

Las bacterias son microorganismos con una enorme capacidad de utilización de diversos compuestos nutritivos, desde moléculas inorgánicas sencillas hasta compuestos orgánicos complejos. La diferencia en la capacidad del empleo de los nutrientes constituye parte de las bases para la identificación tradicional de los microorganismos (Jones, 1982; Krulwich, 1990).

Existen numerosos medios de cultivo que permitirán diferentes propósitos:

- Aislar tipos bacterianos de una población mixta de microorganismos.
- Identificar microorganismos en alimentos, aire, suelos, aguas, lodos o productos de uso diario.
- Caracterizar e identificar los microorganismos según su habilidad para producir cambios químicos en diferentes medios.
- Diferenciar grupos bacterianos cercanamente relacionados, con base en la apariencia macroscópica de las colonias y las reacciones bioquímicas con el medio.

Algunos medios empleados para seleccionar o diferenciar grupos de bacterias son (Atlas, 2006; Merck, 1996; Scharlau, 2011):

Agar Mac Conkey: diseñado para aislar bacilos Gram negativos y de la familia Enterobacteriaceae. El cristal violeta y las sales biliares inhiben el crecimiento de organismos Gram positivos, lo que permite la selección y el aislamiento de bacterias Gram negativas. Las bacterias que tienen la habilidad de fermentar lactosa pueden ser detectadas utilizando el carbohidrato lactosa y el indicador de pH rojo neutro. Las fermentadores de lactosa producen ácido como producto final de su metabolismo, creciendo con la formación de colonias de color rojo-rosado; si la cantidad de ácido producida es grande, la zona periférica al crecimiento se apreciará como una zona roja causada por la precipitación de las sales biliares y la absorción del rojo neutro. Las no fermentadoras de lactosa no producirán ácido, sino que se formarán colonias incoloras y frecuentemente transparentes.

Reacción bioquímica/morfología macroscópica de las colonias	Géneros o especie
Lactosa positiva/rojas con halo turbio o transparente	<i>Escherichia coli</i>
Lactosa positiva/rosadas	<i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i>
Lactosa negativa/incoloras	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , y otras

Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona de caseína (17), peptona de carne (3), NaCL (5), lactosa (10), mezcla de sales biliares (1.5), Cristal violeta (0.001), rojo neutro (0.03), agar-agar (13.5), pH 7.1 ± 0.1.

Agar eosina-azul de metileno (EMB): Este medio de cultivo permite una diferenciación muy clara entre las colonias de bacterias fermentadores de lactosa y aquellos que no la fermentan. La presencia de sacarosa permite para algunos miembros del grupo coliforme fermentarla con más facilidad que la lactosa. Los colorantes eosina y azul de metileno inhiben el crecimiento de la mayoría de los microorganismos Gram positivos.

La enterobacteriácea *Escherichia coli* crece formando colonias azul oscuro con un brillo verde metálico causado por la gran cantidad de ácido producido por el proceso de fermentación y la precipitación de los colorantes en la superficie de su crecimiento. Otras bacterias entéricas, como las del género *Enterobacter*,

producirán colonias rosadas, y mucoides. Las bacterias que no degradan lactosa o sacarosa, se observan incoloras o rosa pálido transparentes las cuales, debido a su transparencia, parecerán tomar el color púrpura del medio de cultivo.

Reacción bioquímica/morfología macroscópica de las colonias	Géneros o especie
Lactosa positiva/verdes con brillo metálico verde, a veces negro verdosas	<i>Escherichia coli</i>
Lactosa positiva/colonias rosadas a violetas	<i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> y otras
Lactosa negativa/transparentes, de color ámbar (amarillo claro)	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>

Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona (10), hidrogenofosfato dipotásico (2), sacarosa (5), lactosa (5), eosina amarillenta (0.4), azul de metileno (0.07), agar-agar (13.5), pH 7.1 ± 0.1 .

Agar Salmonella-Shigella: Medio utilizado para el aislamiento de Salmonelas y algunas cepas de Shigelas. Las sales biliares, el verde brillante y la elevada concentración de tiosulfato y de citrato inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas. Las colonias fermentadoras de lactosa se observarán de color rojo a rosadas debido a la unión de los ácidos al rojo neutro. Con el tiosulfato e iones de hierro se pone de manifiesto la formación de sulfuro por el ennegrecimiento de las correspondientes colonias.

Reacciones bioquímicas / morfología macroscópica de las colonias	Géneros o especie
Lactosa negativa, H ₂ S negativo/incoloras	Mayorías de <i>Salmonella</i> , y <i>Shigella</i>
Lactosa negativa, H ₂ S positiva/transparentes con centro negro	Algunas <i>Salmonella</i> , y <i>Proteus</i>
Lactosa positiva, H ₂ S negativa/rosadas hasta rojas	<i>Escherichia coli</i>
Lactosa positiva, H ₂ S negativa/rosadas hasta de color blanquecino	<i>Enterobacter aerogenes</i>

Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona (10), lactosa (10), bilis de buey desecada (8.5), verde brillante (0.0003), citrato sódico (10), tiosulfato sódico (8.5), citrato de amonio y hierro III (1), rojo neutro (0.025), agar-agar (12), pH 7.1 ± 0.1 .

Agar bismuto sulfito: agar selectivo para aislamiento y diferenciación de *Salmonella typhi* y otras *Salmonellas*. El verde brillante y el bismuto sulfito inhiben bacterias Gram positivas. Las colonias de salmonelas H₂S-positivas presentan ennegrecimiento debido al sulfuro de hierro. La reducción de los iones bismuto a bismuto metálico produce brillo metálico alrededor de la colonia.

Reacción bioquímica/morfología macroscópica de las colonias	géneros o especie
H ₂ S positiva/centro negro borde claro precipitado negro con brillo metálico alrededor de las colonias colonias denominadas <i>ojo de pez</i> o <i>ojo de conejo</i>	Mayoría de las <i>Salmonella</i> no crecen los géneros <i>Salmonella paratyphi A</i> y <i>Salmonella pollorum</i>
H ₂ S negativa/verdes o café claro	Bacterias coliformes <i>Serratia</i> , <i>Proteus</i> y otras

Composición del medio (g/litro): MercK®

Extracto de carne (5), peptona de carne (10), D(+)-glucosa (5), hidrogenofosfato disódico (4), sulfato ferroso (0.3), verde brillante (0.025), bismuto sulfito (8), agar-agar (15), pH 7.6 ± 0.2.

Agar TCBS (agar-tiosulfato-citrato-sales biliares- sacarosa) para el aislamiento y cultivo selectivo de *Vibrio cholerae* y otros vibriones enteropatógenos (*V. parahaemolyticus*, Vibrios NAG). La bilis de buey y el colato sódico inhiben, sobre todo, a los Enterococos. Las elevadas concentraciones de tiosulfato y citrato, así como el medio fuertemente alcalino, inhiben a las Enterobacteriáceas. Solamente algunas cepas de *Proteus* sacarosa-positivas pueden formar colonias amarillas semejantes a las de los vibriones. El indicador mixto azul de timol-azul de bromotimol da lugar a un viraje a amarillo por la formación de ácido al degradar las bacterias la sacarosa.

Morfología macroscópica de las colonias	Géneros o especie
Pequeñas amarillas	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Vibrio cholerae</i> tipo El Tor
Centro verde azulado	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Grandes amarillas	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Diminutas, transparente	Enterobacteriáceas y otros

Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona de caseína (5), peptona de carne (5), extracto de levadura (5), sacarosa (20), NaCl (10), bilis de buey desecada (5), colato sódico (3), citrato sódico (10), tiosulfato sódico (10), citrato de hierro III (1), azul de timol (0.04), azul de bromotimol (0.04), agar-agar (14), pH 8.6 ± 0.2 .

Agar F, agar P y Agar Base King B para Pseudomonas: el agar P favorece la formación de piocianina y/o piorrubina y reduce la producción de fluoresceína. El agar F estimula la formación de fluoresceína y reduce la piocianina y/o piorrubina. La glicerina favorece la producción de pigmentos. La utilización del fosfato tripotásico-3-hidrato en el agar King B, impide el descenso del pH después de la esterilización y así se evita la escasa formación de fluoresceína por parte de la bacteria.

Reacciones bioquímicas/morfología macroscópica de las colonias	Géneros y/o especie
Producción de piorrubina en agar P/ colonias rodeadas de una zona azul hasta verde Producción de fluoresceína en agar F/ colonias rodeadas de una zona amarilla hasta amarillo verdoso. Producción simultánea de fluoresceína y piocianina en agar F/ tono verde fluorescente bajo luz ultravioleta (366 nm).	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Producción de fluoresceína/ tono amarillo fluorescente bajo luz ultravioleta (366 nm).	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Ps fluorescens</i>

Composición del medio Agar P y agar F (g/litro): MercK®

Peptona de caseína (10), peptona de carne (10), sulfato de magnesio (1,5), hidrógenofosfato dipotásico (1,5), agar-agar (12), pH 7.2 ± 0.1 Estos medios requieren una semana de incubación.

Composición del medio Agar base King B (g/litro): MercK®

Peptona-proteosa (20), sulfato de magnesio (1,5), fosfato tripotásico-3-hidrato (1,8), agar-agar (10), pH 7.1 ± 0.1 .

Aditivo glicerina (10 ml) para los tres medios

Agar selectivo para Bacillus cereus: El contenido de manitol permite la separación de la microbiota manitol positivo que se caracteriza por un cambio al amarillo

del indicador de pH del *B. cereus* manitol negativo, pero que forma lecitinasa al degradar la lecitina de la yema de huevo, formando un precipitado blanco.

Reacciones bioquímicas/morfología macroscópica de las colonias	Géneros y/o especie
Manitol negativo y formación de lecitinasa/ colonias rugosas, secas de color rosado hasta violeta rodeada de halo de precipitado blanco	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus cereus</i> var <i>mycoides</i>
Manitol positivo/ colonias con halo amarillento	<i>Bacillus subtilis</i>

Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona de carne (10), extracto de carne (1), cloruro de sodio (10), D-manitol (10), rojo de fenol (0,025) agar-agar (12), pH 7.1 ± 0.1

Aditivos: emulsión de yema de huevo (100 ml), Polimixina B sulfato (0,01 a 0,1 g)

Agar Baird Parker: medio para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*. El cloruro de litio y el telurito inhiben la microbiota acompañante. El aditivo que se debe añadir después de autoclavar el medio, por su contenido de yema de huevo y telurito, frente a las cuales las colonias de *Staphylococcus aureus* producen lipólisis, proteólisis y desarrollan colonias negras (por la reducción de telurito a telurio). El piruvato sódico y la glicina, incrementa el crecimiento del *S. aureus*.

Reacciones bioquímicas/ morfología macroscópica de las colonias	Géneros o especie
Formación telurio, lipólisis, proteólisis/negras, brillantes con un halo claro (2-5 mm), y dentro del halo anillos opacos (visibles después de 48 horas de incubación)	<i>Staphylococcus aureus</i>
Formación telurio/negras, brillantes con borde o halo opacos (visibles después de 24 horas de incubación)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Cafés claras hasta negras ausencia de bordes o halos	<i>Micrococcus</i>
Cafés oscuras	<i>Bacillus</i>

Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona de caseína (10), extracto de carne (5), extracto de levadura (1), piruvato sódico (10), glicina (12), cloruro de litio (5), agar-agar (15), pH 6.8 ± 0.2 .

Aditivo: emulsión de yema de huevo y telurito (50 ml), sulfametacina (0,05 g).

Agar salado manitol: este medio de cultivo contiene altas concentraciones de sal (7.5 % de NaCl), lo cual inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias diferentes a los *Staphylococcus*. El manitol incorporado en el medio realiza una función diferencial, pues solo algunos *Staphylococcus* pueden fermentarlo. La adición de rojo de fenol, como indicador de pH, permite detectar la producción de ácido como resultado de la vía fermentativa para el metabolismo del manitol, estos microorganismos forman una zona amarilla periférica a su crecimiento. *Staphylococcus* que no fermenten el manitol no producirán este cambio de coloración.

Reacciones bioquímicas/morfología macroscópica de las colonias	Géneros y/o especie
Manitol positivo/con halo amarillo luminoso* crecimiento abundante	<i>Staphylococcus aureus</i>
Manitol negativo/sin halo amarillo luminoso crecimiento escaso	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y otros

*el halo luminoso se difunde por toda la caja

Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona (10), extracto de carne (10), D-manitol (10), cloruro de sodio (75), rojo de fenol (0,025), agar-agar (12), pH 7.4 ± 0.1 .

Agar bilis esculina: la presencia de sales biliares inhibe bacterias diferentes a los enterococos. Aunque si hay presencia de *Streptococos* del Grupo D, *Aerococos* y *Listerias* que toleran las sales biliares y pueden degradar la esculina. El glucósido esculina es hidrolizado por los enterococos convirtiéndolo en glucosa y esculetina. Se forma un complejo de color verde hasta negro por la unión de la esculetina con iones de hierro (III).

Reacciones bioquímicas/morfología macroscópica de las colonias	Géneros y/o especie
Degradación de la esculina/el medio se torna de verde a negro alrededor de la colonias	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i>

Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona de carne (5), extracto de carne (3), esculina (1), bilis de buey (40), citrato férrico(0,5), agar-agar (14,5), pH 6.6 ± 0.2 .

Materiales

Asa bacteriológica redonda y recta

Mecheros

Lámpara de luz U.V.

Cultivos bacterianos puros

Medios selectivos y diferenciales

Procedimiento

1. Reconozca junto al docente e identifique la apariencia y color de cada uno de los medios de cultivo.
2. Realice una siembra por aislamiento (agotamiento), según las indicaciones del docente.
3. Incube las cajas durante 12 a 24 horas a 37 °C.
4. Realice las lecturas de las cajas de Petri y complete los siguientes cuadros:

Nombre del medios					
Clase de medio de cultivo					
Indicador de pH (si lo tiene)					
Inhibidor (si lo tiene)					
Reacciones bioquímicas que suceden					

Nombre del medios					
Clase de medio de cultivo					
Indicador de pH (si lo tiene)					
Inhibidor (si lo tiene)					
Reacciones bioquímicas que suceden					

4.4 Pruebas bioquímicas

Objetivo

Identificar algunos géneros bacterianos de la familia Enterobacteriaceae y otros géneros Gram negativos, mediante el uso de pruebas bioquímicas.

Introducción

Las bacterias requieren aporte continuo y de acceso inmediato de energía, que es usada en procesos de biosíntesis, transporte activo, translocación de proteínas a través de la membrana citoplasmática, movimiento flagelar y bioluminiscencia.

Los procesos químicos que ocurren en el interior de la célula constituyen una compleja cadena de reacciones, en las cuales coexisten los procesos de síntesis-anabólicos y los de tipo degradativo-catabólicos. La suma total de estos cambios se denomina metabolismo.

El estudio de las características bioquímicas de los microorganismos constituye un aspecto importante para la clasificación microbiana. Su fundamento radica en la dotación enzimática bacteriana, visualizada a través de la acción de las

mismas sobre determinados sustratos con agentes reveladores (Parés, & Juárez, 1996).

Para observar las reacciones bioquímicas se utilizan diferentes agentes reveladores que permiten visualizarlas. A los medios de cultivo se le adicionan indicadores de pH, sales hierro, aminoácidos azufrados, entre otros.

A nivel comercial se encuentran pruebas bioquímicas para la identificación de bacilos Gram negativos, bacilos Gram negativos no fermentadores de glucosa y bacilos Gram positivos Son sistemas para la identificación de Enterobacterias, bacilos Gram negativos tipo *Pseudomonas* y Bacilos Gram positivos respectivamente.

Consiste en una plantilla con microtubos o pocillos conteniendo medios de cultivo deshidratados que se rehidrata al agregar una suspensión bacteriana y se inicia las reacciones del análisis. Después de un período de incubación, se examinan los pocillos para observar cambios de color.

Materiales

Asa bacteriológica redonda y recta

Mecheros

Cultivos bacterianos puros

Pruebas bioquímicas o medios de reacción

Prueba de la oxidasa

Agar Simons Citrato

TSI (triple azúcar-hierro)

LIA (agar lisina hierro)

SIM (movilidad, indol, sulfuro)

Caldo MR (rojo de metilo)

Caldo VP (Voges Proskauer)

Caldo urea

Caldo nitrato

Gelatina

Reactivos

Rojo de metilo

α -Naftol al 5 % (en alcohol etílico) y KOH al 40 %

Reactivo de Gries o Reactivo A (α -naftilamina o dimetil- α -naftilamina + ácido acético) y Reactivo B (ácido sulfanílico + ácido acético)

Reactivo de Kowács o Reactivo de Ehrlich

Procedimiento

1. Realizar frotis y coloración de Gram de las colonias aisladas de los cultivos selectivos.
2. Realizar la prueba de oxidasa: esta prueba está ligada a las enzimas oxidativas denominadas citocromos, involucradas en la cadena respiratoria. Esta prueba es útil para determinar aquellos microorganismos que carecen de la enzima o son anaerobios obligados.

La prueba puede realizarse *indirectamente*: con tiras de papel, extendiendo una colonia sospechosa sobre la tira comercial o colocando sobre una tira de papel filtro puesta sobre una lámina, varias gotas de reactivo recién preparado de tetrametil-p-finilendiamina al 1 % en agua destilada estéril. Con el asa previamente esterilizada, tomar una colonia de los microorganismos en estudio y frotarla sobre el papel humedecido.

Reacción positiva: color azul.

Reacción negativa: sin color.

Pruebas bioquímicas

1. Anote los colores de las pruebas bioquímicas.
2. Escoja una colonia característica a partir de los cultivos puros y siembre un set de medios de cultivo para pruebas bioquímicas en el siguiente orden y técnica:

- Agar Simons Citrato: estría con asa recta. Se incuba 24 - 48 horas a 37°C.
- TSI (triple azúcar-hierro) y LIA: se pica hasta el fondo pero sin tocar el vidrio, para evitar que se pierda la cámara anoxigénica; al sacar el asa, hacer una estría sobre la superficie, de esta forma queda sembrado el medio en toda su profundidad y superficie. Se incuban **a 37°C y se realiza la lectura a las 18 – 24 horas.**
- SIM y gelatina: picar el medio por el centro y hasta dos terceras partes de profundidad, procurando sacar el asa por el mismo orificio. Se incuban **a 37° C durante 24- 48 horas.**
- Caldo RM, caldo VP, caldo urea, y nitrato, debido a que son medios líquidos, basta agitar el asa redonda dentro de ellos suavemente. El caldo RM, se incuba a 37°C durante 48- 72 horas (nunca menos de 48). El caldo VP y caldo nitrato 24 horas, de incubación a 37 ° C. El caldo urea, se incuba entre 2 y no más de 6 horas a 36 °C.

3. Interprete la actividad bioquímica.

Lectura de las pruebas bioquímicas

(McFaddin, 1980, Atlas 2006, Merck 1996, Scharlau 2011)

- **Determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono:**

Agar Simons citrato:

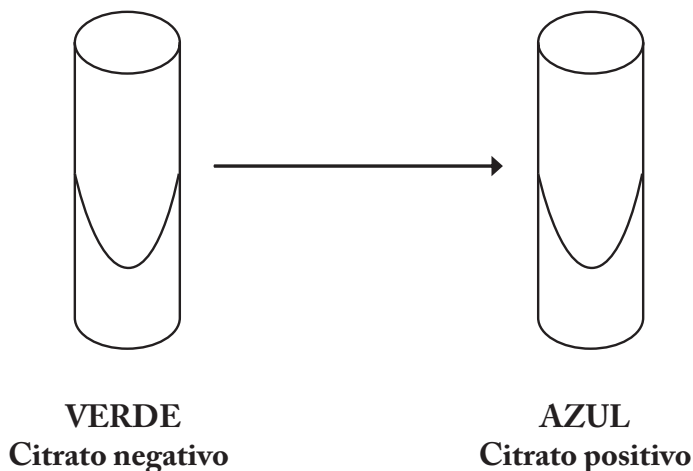
Algunos microorganismos heterotróficos pueden crecer y multiplicarse en un medio inorgánico, que contiene citrato de sodio como única fuente de carbono, mediante la enzima citritasa (citrato oxalacetato liasa), o citrato desmolasa (requiere cationes de Mg o Mn). Como fuente de nitrógeno usa las sales de amonio con producción de amoníaco y posterior formación de NH_4OH , que alcaliniza el medio ocasionando un viraje de verde a azul. El indicador presente en el medio es azul de bromotimol ($\text{pH} > 7,6$ azul).

Reacción:



Reacción positiva: azul brillante

Reacción negativa: no hay cambio de color



Reacción bioquímica	Géneros o especie
Citrato positivo	
Azul oscuro	<i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Salmonella paratyphi B</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Arizona</i> y otros
Citrato negativo o inhibido	
Verde	<i>Escherichia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Salmonella thyphi</i> , <i>Salmonella paratyphi A</i> y otros

Composición del medio (g/litro): MercK®

Dihidrógenofosfato amónico (1), dihidrógenofosfato dipotásico (1), NaCl (5), citrato sódico (2), sulfato de magnesio (0.2), azul de bromotimol (0.08), agar-agar (13), pH 6.6 ± 0.1 .

- **Determinar la capacidad de un microorganismo de degradar carbohidratos (TSI, rojo de metilo, Voges Proskauer)**

TSI (triple azúcar-hierro):

- a. Capacidad de un microorganismo de degradar glucosa, sacarosa y lactosa, con producción o no de gas (H_2 , CO_2)

los resultados que se pueden observar son los siguientes: **hay fermentación de azúcares (glucosa, sacarosa y lactosa), hay fermentación de glucosa pero no de lactosa ni sacarosa, y no hay fermentación de azúcares.**

- b. Capacidad de un microorganismo de producir ácido sulfhídrico (H_2S)

a. Degradación de azúcares:.

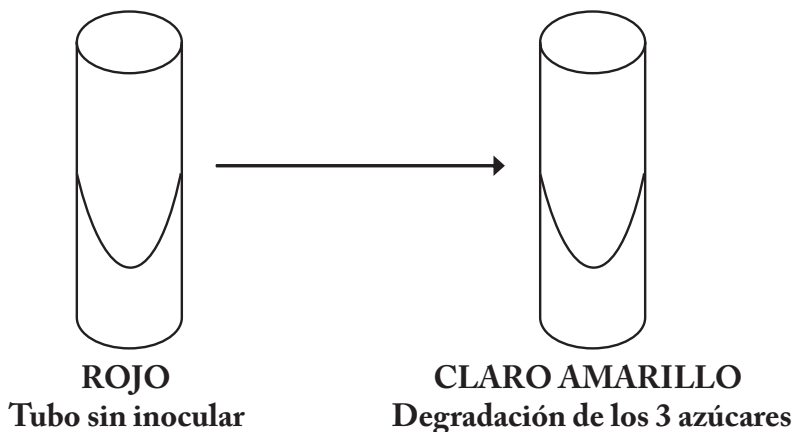
(A): ácido

(K): alcalino

Formación de gas: burbujas, rupturas, desplazamiento del medio.

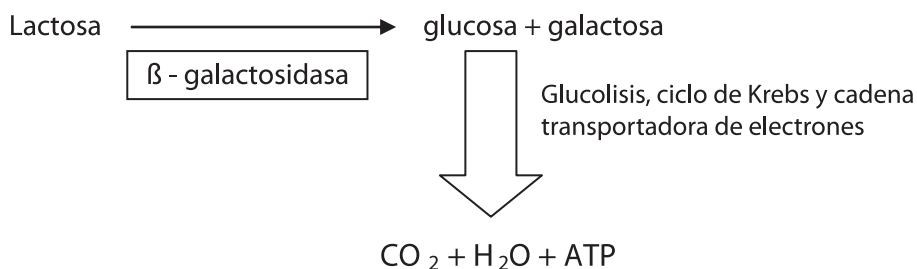
Resultados:

A/A: color *amarillo* en todo el tubo. Hay degradación de los tres azúcares.



Reacciones:

1. *Metabolismo o respiración aeróbica de los azúcares en la superficie o pico de flauta*

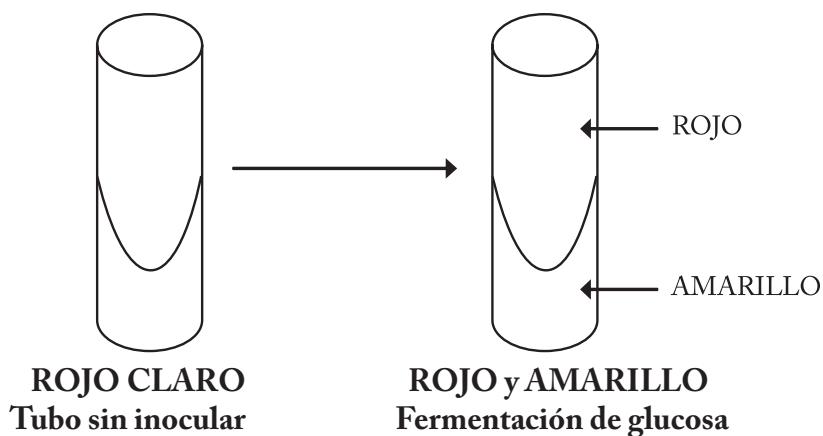


2. Metabolismo o Fermentación de la glucosa en la capa inferior



La fermentación de los azúcares provoca la acidificación del medio con el consiguiente viraje del indicador rojo de fenol a amarillo

K/A: color rojo en la superficie y amarillo en el fondo. Solo hay fermentación de glucosa.



Reacción:

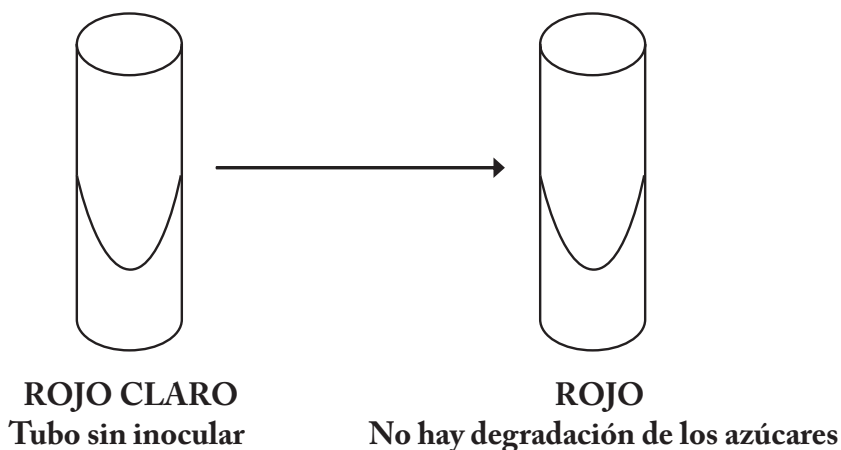
Metabolismo o Fermentación de la glucosa en la capa inferior



Después de 18 a 24 horas de incubación la baja concentración de glucosa (0.1 %) ha sido consumida por completo y el microorganismo comienza a utilizar

las peptonas, esto produce liberación de amoníaco que da lugar a pH alcalino con el rojo de fenol (de ahí el rojo en la superficie o pico de flauta) y formación de productos ácidos dando un pH ácido (amarillo) en el fondo.

K/K: color rojo en todo el tubo. No hay degradación de los azúcares.



Reacción:

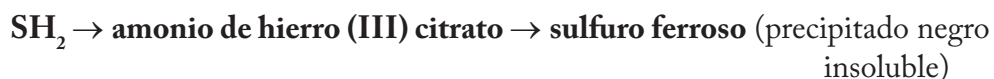


Hay microorganismos que son incapaces de degradar la glucosa y la lactosa, pero crecen catabolizando las peptonas en condiciones aeróbicas y anaerobias, dando lugar a formación de productos alcalinos dando un pH alcalino (rojo en todo el tubo) .

b. Producción de ácido sulfhídrico (H_2S):

Producción de H_2S : formación de color negro en cualquier parte del medio.

Reacción:



Reacción bioquímica	Géneros o especie
A/A: fermentación de los tres azúcares	
Amarillo en todo el tubo con/sin gas	<i>Escherichia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> y otras
A/A: fermentación de los tres azúcares, y SH ₂ (+)	
Amarillo en todo el tubo Precipitado negro en cualquier parte del tubo	<i>Arizona</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
K/A: fermentación de glucosa	
Color rojo en la superficie y amarillo en el fondo. Con/sin gas	<i>Escherichia cepas</i> sin movilidad, <i>Enterobacter hafniae</i> , <i>Serratia</i> , <i>Shigella</i> , y otras
K/A: fermentación de glucosa y SH ₂ (+)	
Color rojo en la superficie y amarillo en el fondo. Con/sin gas	<i>Edwardsiella</i> , <i>Arizona</i> , <i>Citrobacter</i> y otras
K/K: no hay fermentación de azúcares	
Color rojo en todo el tubo	<i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona de caseína (15), peptona de carne (5), extracto de carne (3), extracto de levadura (3), NaCl (5), lactosa (10), sacarosa (10), D- glucosa (1), amonio de hierro (III) citrato (0.5), tiosulfato sódico (0.3), rojo de fenol (0.024), agar-agar (12), pH 7.4± 0.1.

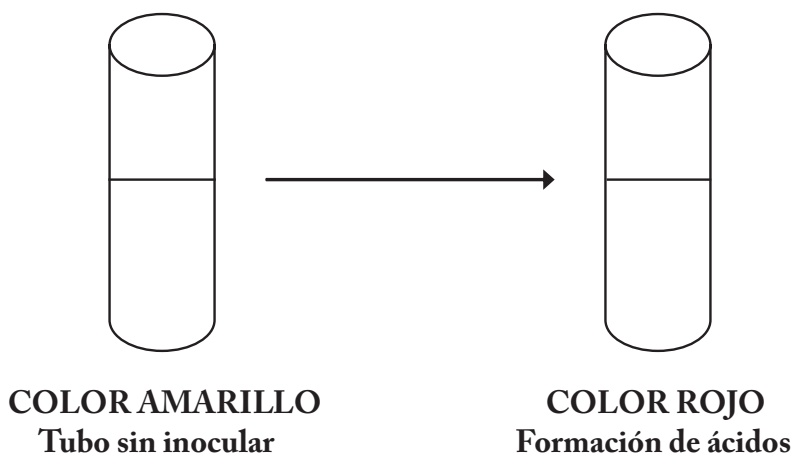
Rojo de metilo:

Determinar la capacidad de una bacteria para fermentar la glucosa por la vía ácido-mixta. Después de la incubación se adiciona el indicador de pH rojo de metilo, el cual tiene la propiedad de determinar la concentración de hidrogeniones de los productos ácidos mixtos (ácido láctico, acético, fórmico, succínico). Si bien muchas especies de bacterias son capaces de producir grandes cantidades de ácidos en las fases iniciales de la incubación, sólo los microorganismos capaces de mantener el pH bajo luego de una incubación prolongada superando el sistema amortiguador de pH del medio pueden considerarse rojo de metilo positivo.

Para interpretar esta prueba se debe adicionar 1 gota de reactivo de rojo de metilo por cada ml del caldo después de la incubación.

Reacción positiva: desarrollo de un color rojo.

Reacción negativa: sin cambio de color.



Reacción bioquímica	Géneros o especie
Fermentación glucosa positiva	
Rojo	<i>Escherichia coli</i> , y otras
Fermentación glucosa negativa	
Amarillo	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella</i>

Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona de carne (7), D(+)-glucosa (5), tampón de fosfatos (5), pH 6.9± 0.1.

VP (Voges Proskauer):

Determinar la capacidad de una bacteria para fermentar la glucosa por la vía butanodiol o butanodiólica. Los microorganismos rojo de metilo negativo también producen estos ácidos, pero finalmente se obtiene una concentración menor de hidrogeniones, debido a que los microorganismos continúan

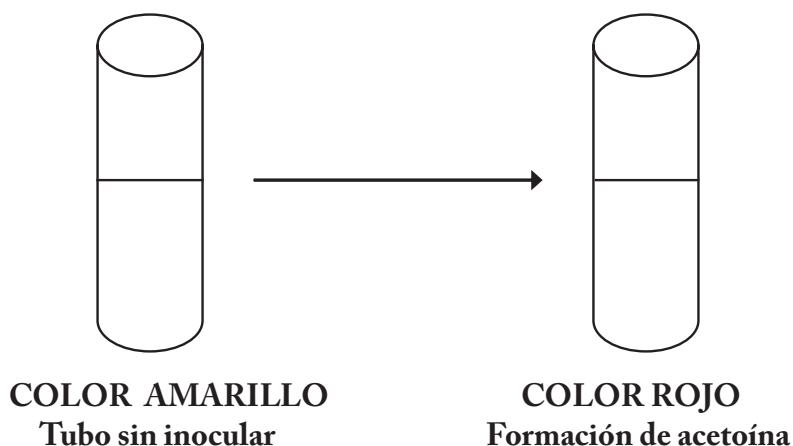
degradando los ácidos produciendo carbonatos y CO_2 . Las proteínas las degradan formando compuestos de amonio, y el ácido pirúvico formado en la degradación de glucosa es metabolizado hasta la producción de acetoína. Todos estos productos de la fermentación contribuyen a que el pH suba casi hasta la neutralidad, por lo tanto cesa la producción de hidrogeniones y aumenta la concentración de CO_2 .

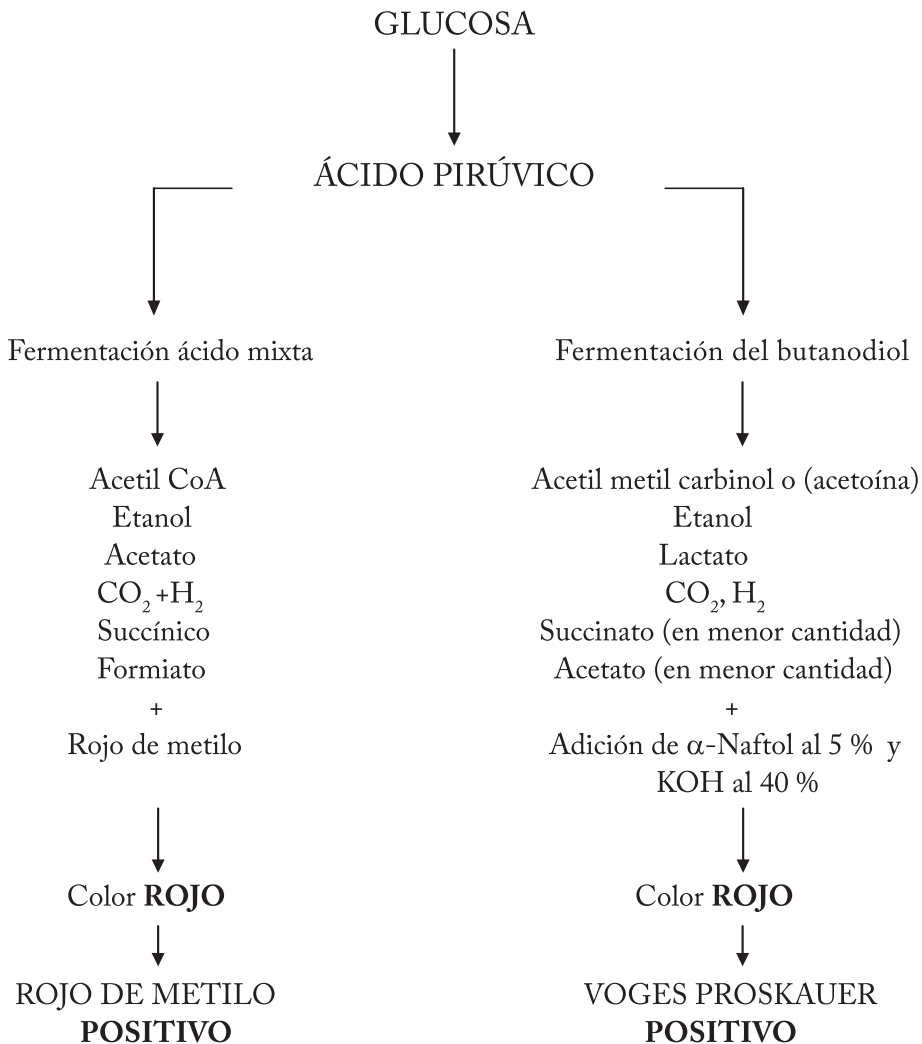
Para interpretar esta prueba se debe agregar después de la incubación:

- (naftol al 5 % (en alcohol etílico) y KOH al 40 %.
- 3 gotas de (naftol y 2 gotas KOH al 40 % por cada 5 ml de caldo.
- Agitar el tubo suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico, a fin de oxidar la acetoína y obtener una reacción de color.
- Dejar reposar 20 minutos, se inicia el cambio de color en la superficie, que se intensifica en el transcurso de aproximadamente 2 horas.

Reacción positiva: rojo.

Reacción negativa: sin cambio de color.



Reacciones:

Reacción bioquímica	Géneros o especie
Fermentación glucosa débilmente positivo o positivo	
De anaranjado a rojo	<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter</i> y otras
De anaranjado a amarillo	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> y otras
Rojo	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> y otros
fermentación glucosa negativa	
Sin reacción amarillo	<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter</i> y otras

Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona de carne (7), D- glucosa (5), tampón de fosfatos (5), pH 6.9± 0.1.

- **Determinar la capacidad de un microorganismo de degradar los nitratos y urea como fuente de nitrógeno**

Prueba de reducción de nitratos a nitritos:

La reducción de nitratos incluye todos los procesos en los que el nitrato (NO_3^-) se reduce a nitritos (NO_2^-), y en algunos casos pueden llegar hasta nitrógeno molecular (N_2). Tiene lugar generalmente en condiciones de respiración o metabolismo anaeróbico.

La mayoría de las bacterias aerobias facultativas reducen nitratos en forma anaeróbica.

Reacción:



La presencia de nitritos en el medio se detecta añadiendo después de la incubación:

Reactivo de Griess o Reactivo A y B:

Composición Reactivo A (alfa-naftilamina o dimetil -alfa- naftilamina + ácido acético).

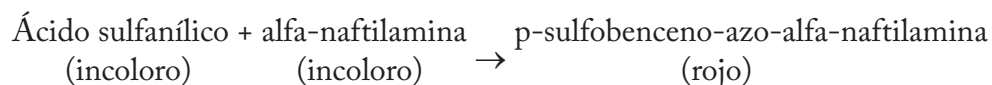
Composición Reactivo B (ácido sulfanílico + ácido acético).

Añadir: 5 gotas del reactivo de Griess o

5 gotas del reactivo A y 5 gotas del reactivo B / por cada ml de medio.

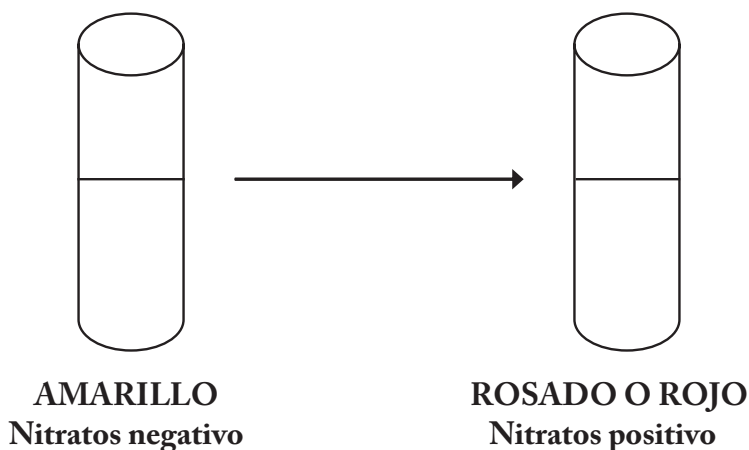
Química de reacción de los reactivos:

Reacción:



Reacción positiva: color rosado a rojo intenso.

Reacción negativa: no hay cambio de color.



La mayoría de los miembros de la familia Enterobacteriaceae son generalmente son nitrato positivo.

Composición del medio (g/litro): MercK®

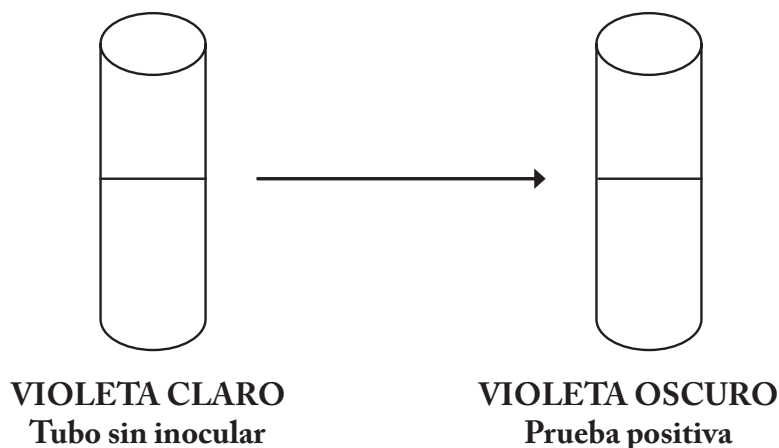
Peptona de carne (8.6), NaCl (6.4), nitrato potásico (1.5), pH 7.2 ± 0.1

Prueba de la urea:

Determinar la capacidad de un microorganismo de desdoblar la urea, por la acción de la enzima ureasa (enzima constitutiva).

Reacción positiva: violeta oscuro.

Reacción negativa: violeta claro.



Reacción:

Urea $\longrightarrow$ anhídrido carbónico + 2 (amoníaco) + carbonato de amonio

Reacción bioquímica	Microorganismos
Urea positiva	
Rojo	<i>Proteus, Morganella</i> y otras
Urea débilmente positivo o negativo	
Amarillo	<i>Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia Shigella, Salmonella</i> y otras

Composición del medio (g/litro): MercK® extracto de levadura (0.1), dihidrógenofosfato dipotásico (9.1), hidrógenofosfato disódico (9.5), urea (20), rojo de fenol (0.01), pH 6.8± 0.1.

- **Determinar la capacidad de un microorganismo de degradar las proteínas (LIA, SIM y gelatina)**

LIA (agar lisina hierro):

Medir la capacidad enzimática de un microorganismo para utilizar el aminoácido lisina:

- a. Descarboxilación y deaminación de la lisina para formar una amina (cadaverina).
- b. Capacidad de un microorganismo de producir ácido sulfhídrico (H_2S).
Formación de color negro en cualquier parte del medio.
- c. Producción de CO_2 : espacios aparentemente vacíos en cualquier parte del medio.

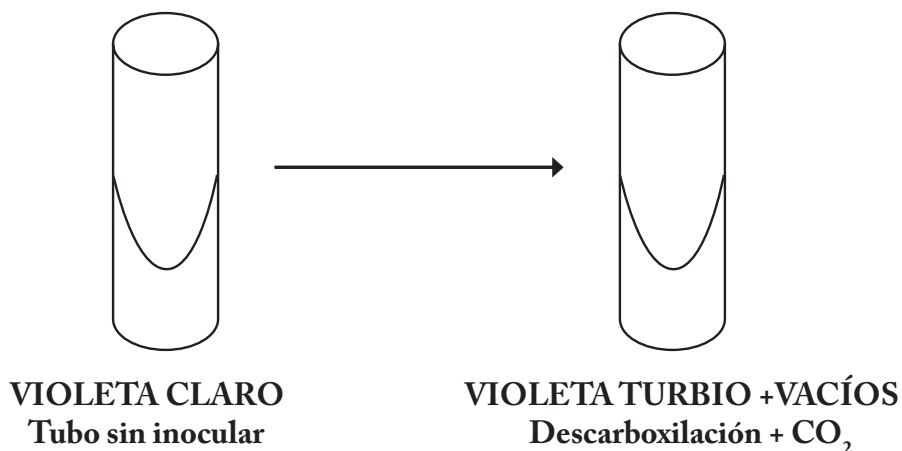
Descarboxilación y deaminación de la lisina:

(K): alcalino

(A): ácido

(R): rojo

K/K: Descarboxilación de la lisina: (superficie inclinada y fondo de color violeta) indica presencia de cadaverina + producción de CO_2

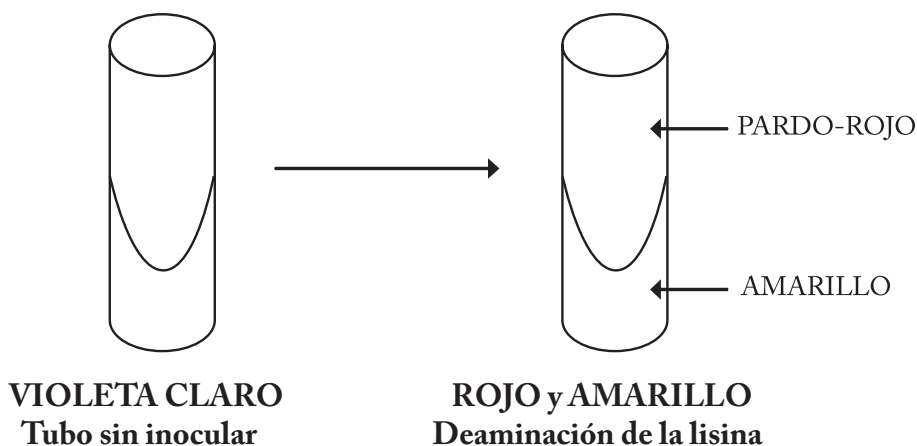


Reacción:

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 ($-\text{COOH}$) dando una amina o una diamina y CO_2 .

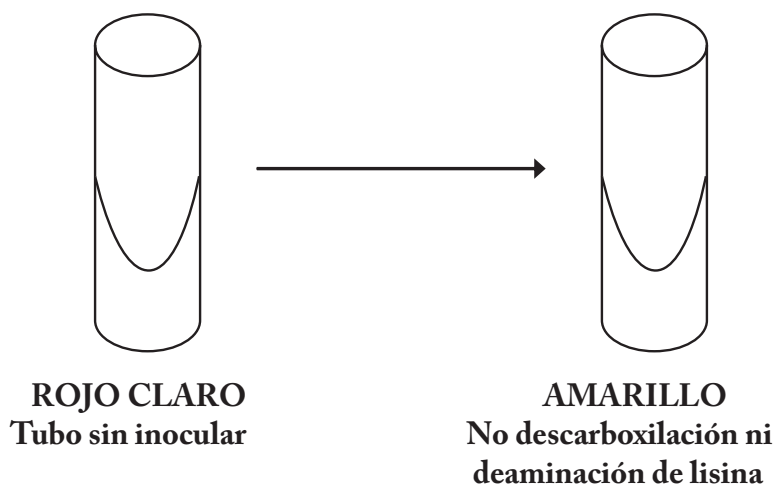
En este caso el aminoácido L-lisina sufre la descarboxilación en condiciones anaeróbicas y en un medio ácido -6.0- (es necesario que se produzca previamente esta acidificación, por la fermentación de la glucosa), para dar cadaverina (una diamina) y CO_2 por acción de la enzima específica lisina descarboxilasa (enzima adaptativa o inducida), estos productos producen un viraje al violeta del indicador de pH al alcalinizarse el medio.

R/A: Deaminación de lisina: (superficie inclinada pardo-rojo y fondo amarillo).

Reacción:

Algunas cepas desaminan la lisina a ácido α -cetocarbónico. Este último forma compuestos pardo-rojizos en la superficie inclinada en condiciones aeróbicas.

A/A: No descarboxilación ni deaminación de lisina (superficie inclinada y fondo amarillo) indica solamente fermentación de glucosa



Reacción:

Microorganismos lisina negativos, pero fermentadores de glucosa, producen un viraje al amarillo de la totalidad del medio de cultivo.

Producción de H₂S

Reacción positiva: coloración negra en el medio

Reacciones bioquímicas	Géneros o especie
K/K: descarboxilación de la lisina, H ₂ S (+)	
Violeta en todo el tubo Gas Coloración negra en el medio	<i>Arizona</i> , algunas <i>Salmonelas</i> , <i>Edwardsiella</i>
R/A: deaminación de la lisina	
Superficie inclinada pardo-rojo y fondo amarillo Coloración negra en el medio	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> y otras especies de <i>Proteus</i>
A/A: no descarboxilación ni deaminación de lisina	
Amarillo en todo el tubo	<i>Citrobacter</i> y otras

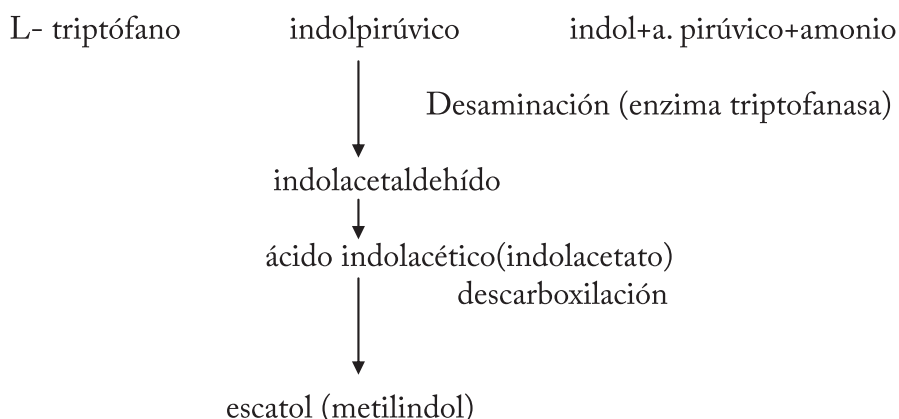
Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona de carne (5), extracto de levadura (3), D (+)-glucosa (1), L-lisina monoclóridato (10), tiosulfato sódico (0.04), citrato de amonio y hierro III (0.5), púrpura de bromocresol (0.02), agar-agar (12.5), pH 6.7± 0.1

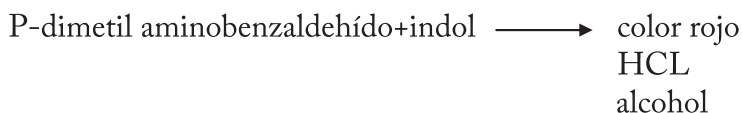
SIM (movilidad, indol, sulfuro)

- Determinar la capacidad de un microorganismo de desdoblar el aminoácido triptófano y producir indol
- Capacidad de un microorganismo de producir ácido sulfhídrico (H₂S).
- Determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil.

a. Producción de indol:

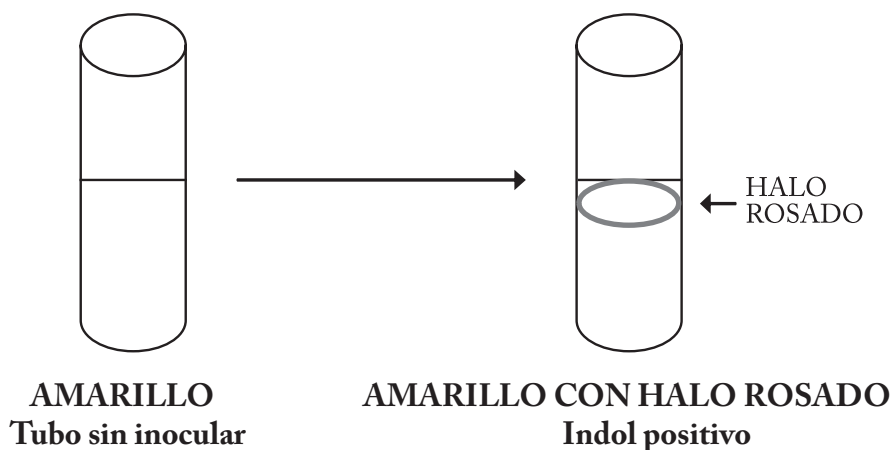


La presencia del indol, se detecta añadiendo el reactivo de Kovács o Ehrlich, que se adiciona después de la incubación (5 gotas del reactivo para cada 4 ml de medio), forma un anillo color rojo o cereza en la superficie del medio (capa de alcohol).



Reacción positiva: formación de un anillo rojo o violeta.

Reacción negativa: anillo incoloro.



b. Producción de H_2S

Reacción positiva: coloración negra en el medio.

c. Movilidad

Reacción positiva: turbidez u opacidad.

Reacción negativa: solo crecimiento en la picadura.

Reacciones bioquímicas	Géneros o especie
Indol positivo	
Formación de un anillo rojo o violeta	<i>Escherichia</i> , <i>Proteus vulgaris</i> y otras
Indol negativo	
No formación anillo	<i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> y otras
Indol (+) y H_2S (+)	
Formación de un anillo rojo o violeta , negro en zona de crecimiento	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Edwardsiella</i>
Indol (-) y H_2S (-)	
No formación anillo	<i>Hafnia</i> , <i>Serratia</i> y otras
Indol (+) y H_2S (+) y movilidad (+)	
Formación de un anillo rojo o violeta , negro en zona de crecimiento y turbidez	<i>Edwardsiella</i>

Reacciones bioquímicas	Géneros o especie
Indol (+) y H₂S (-) y movilidad (+)	
Formación de un anillo rojo o violeta y turbidez	<i>Providencia</i>
Indol (+) y H₂S (-) y movilidad (+/-)	
Formación de un anillo rojo o violeta y o no turbidez	<i>Escherichia</i>
Indol (-) y H₂S (-) y movilidad (+)	
Turbidez	<i>Hafnia, Serratia</i>
Indol (-) y H₂S (+) y movilidad (+)	
Negro en zona de crecimiento y turbidez	<i>Arizona</i> y otras

Composición del medio (g/litro): MercK®

Peptona de caseína (20), peptona de carne (6.6), citrato de amonio y hierro III (0.2), tiosulfato sódico (0.2), agar-agar (3), pH 7.3± 0.1

Licuefacción de la gelatina:

La gelatina es una proteína que cuando se disuelve en agua puede ser utilizada por aquellos microorganismos que poseen la enzima extracelular gelatinasa dando lugar a su licuefacción.

Reacción positiva: el medio se torna líquido.

Reacción negativa: el medio permanece sólido.

Las lecturas de las pruebas bioquímicas se harán en el grupo de trabajo, se debe colorear cada uno de los tubos y completar el siguiente cuadro:

Pruebas	Reacciones	Resultado
Oxidasa		
Agar citrato		
TSI	Lactosa, sacarosa, glucosa	
	Glucosa	
	Gas	
	H ₂ S	
Rojo de metilo		
VP		
Nitratos		
Urea		
LIA	Descarboxilación de la lisina	
	Deaminación de la lisina	
	H ₂ S	
	CO ₂	
SIM	H ₂ S	
	Indol	
	Movilidad	

4.5 Requerimientos de oxígeno y factores osmóticos de las bacterias

Objetivo

Diferenciar bacterias de acuerdo con sus requerimientos de oxígeno y factores osmóticos.

Introducción

Las bacterias presentan un amplio potencial en su capacidad de utilizar para el crecimiento, fuentes de nutrición diversas que van desde sustancias completamente inorgánicas hasta materiales orgánicos muy complejos. Pero otros factores, tales como pH, tensión de oxígeno, presión osmótica (concentración de sal y azúcar), temperatura, afectan la habilidad del microorganismo para crecer.

Tioglicolato: medio utilizado para el cultivo de aerobios, microaerófilos, anaerobios facultativos y aerotolerantes y anaerobios estrictos. Las sustancias reductoras, tioglicolato y cisteína proporcionan una anaerobiosis suficiente, incluso para anaerobios exigentes. Los grupos sulfhidrilos (aportados por la cisteína, tioglicolato, glutatión), enlazan el oxígeno para formar agua e impiden la formación y acumulación de peróxido de hidrógeno en el medio, además de inactivar junto al tioglicolato el efecto antibacteriano de compuestos de arsénico, mercurio y de otros metales pesados. El tioglicolato de sodio disminuye el potencial redox del medio de cultivo y la elevada viscosidad por la presencia de una baja cantidad de agar, retarda la dispersión de CO₂ y O₂. La resazurina sódica actúa como un indicador de la óxido-reducción, que es de color rosado fucsia en presencia de oxígeno (Neidhart et al., 1990; Tortora, 2010).

Materiales

Asa bacteriológica redonda

Suspensiones bacterianas de cepas de referencia de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp

Géneros y/o especies de Enterobacterias aisladas en los laboratorios anteriores

Gradillas

Caldo de tioglicolato con indicador

Solución al 3 % de peróxido de hidrógeno

Placas portaobjetos

Caldo nutritivo (CN) con NaCL a 1 %, 6.5 % y 15 %

Jarra de anaerobiosis

Baño serológico a 45 °C

Procedimiento

Requerimientos de oxígeno

1. Caliente los tioglicolato a 45 °C/10 min con el fin de excluir el oxígeno (en medio con resazurina)
2. Inocule tres tubos de tioglicolato con cada una de las cepas de referencia *Escherichia coli*, se siembra en profundidad en el medio de cultivo y el *B. subtilis* en la parte superior del tubo.
3. Inocule en profundidad tres tubos de tioglicolato con cada uno de los microorganismos (familia Enterobacteriaceae aislados en la práctica anterior)
4. Cubra cada tubo con agar agua (1 cm) y tapar el tubo.
5. Llevar a incubación a 37 °C por 48-72 horas.
6. Realice la lectura y complete el siguiente cuadro:

Bacteria inoculada	Crecimiento parte superior del tubo	Crecimiento a lo largo del tubo
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Bacillus</i> sp		
Bacteria inoculada por cada grupo de trabajo		

Catalasa

La catalasa es una enzima que degrada el peróxido de hidrógeno:



1. Tomar una colonia de cada una de las bacterias de la familia Enterobacteriaceae.
2. Depositarla en el centro de un portaobjetos limpio.
3. Adicionar una gota de peróxido de hidrógeno.
4. Observar la producción de burbuja.

Presión osmótica

1. Siembre con un asa bacteriológica redonda en tubos del caldo nutritivo con NaCL de la siguiente manera:

CN con NaCL		
1 %	6.5 %	15 %
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Bacillus</i> sp	<i>Bacillus</i> sp	<i>Bacillus</i> sp
Bacteria familia Enterobacteriaceae	Bacteria familia Enterobacteriaceae	Bacteria familia Enterobacteriaceae

3. Incube los CN a 37 °C /24 a 48 horas.

Lectura

Realice las lecturas de los tubos y estime el crecimiento teniendo en cuenta:

-: sin crecimiento

+: crecimiento escaso

++: crecimiento moderado

+++ : crecimiento abundante

Y complete el siguientes cuadro:

	NaCL		
Microorganismo Inoculado	1%	6.5%	15%

Sistema de jarra anaeróbica

La jarra anaeróbica, mediante el uso de compuestos químicos, permite la producción de condiciones anaeróbicas. A medida que se explica la jarra, escriba las diferentes partes (Figura 23).

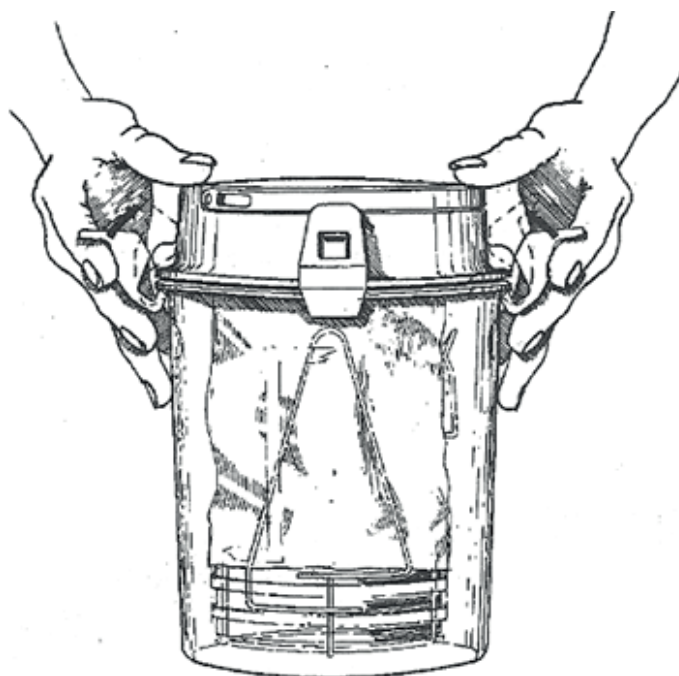


Figura 23 Jarra de anaerobiosis.

Fuente: manual marca OXOID® del Laboratorio Grupo de Investigación Biología Ambiental UPTC

Los compuestos químicos para anaerobiosis: Gas Generating Kit OXOID® (borohidruro de sodio, ácido tartárico y bicarbonato de sodio), o Anaerocult A MERCK® (tierra silícea, hierro en polvo, ácido cítrico, carbonato sódico), o Anaerogen OXOID® (ácido ascórbico).

- Fijan el oxígeno y producen un medio libre de oxígeno (anaerobio).
- Reaccionan con el agua y producen hidrógeno y una atmósfera de dióxido de carbono.
- El catalizador de paladio (algunas jarras aún lo tienen) combina el oxígeno con el hidrógeno y forma agua.

Instrucciones de manejo

1. Humedezca la tira indicadora de anaerobiosis y colóquela dentro de la jarra.
2. Introduzca las cajas y/o tubos.

3. Introduzca el compuesto químico, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.
4. Cierre inmediatamente y herméticamente la jarra de anaerobiosis.
5. Cerciórese de que el indicador de anaerobiosis cambie de color, con el fin de confirmar la anaerobiosis creada.
6. Lleve a incubación.

