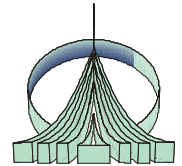




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Atlas de Pruebas Bioquímicas para Identificar Bacterias

Q.F.B. Lucía Bailón Lira

Q.F.B. Roberto Cruz González Meléndez

M. en C. Armando Cervantes Sandoval

© 2003. Universidad Nacional Autónoma de México

Material de uso libre con fines académicos, con su correspondiente cita o referencia

Prohibida su reproducción total o parcial con fines de lucro

Comentarios, Sugerencias, Correcciones o Porras; al E-mail: arpacer@servidor.unam.mx. Todas serán consideradas e incluidas en la siguiente versión.

Guía de uso. Para revisar el texto basta con dar un clic en el contenido, sobre el tema de interés. Para regresar al contenido dar un clic sobre el título o subtítulo de la información que se esté revisando.



CONTENIDO

	Página
Introducción	7
Generalidades de bacterias	9
Morfología y estructura	9
Nutrición	10
Quimioheterótrofos	12
Autótrofos	12
Fotoautótrofos	12
Fotoheterótrofos	12
Reproducción	13
Transformación	14
Conjugación	14
Transducción	15
Identificación bacteriana	16
Medios de cultivo	16
Medios básicos	18
Medios enriquecidos	19
Medios selectivos, diferenciales y de enriquecimiento	20
Medios especiales	22
Clasificación por consistencia	23
Sólidos	
Semisólidos	
Líquidos	
Clasificación por composición	23
Sintéticos	
No sintéticos	



Técnicas de inoculación	24
En placa	26
Estría cruzada	
Estría en "Z"	
Estría simple	
Siembra masiva	
Vaciado en placa	
En tubo: medio semisólido	27
Siembra en medios líquidos	28
En tubo: medios sólidos	29
Incubación de los medios	30
Morfología colonial	31
Identificación basada en características metabólicas: Pruebas bioquímicas	35
Fermentación de carbohidratos	35
Prueba de citrato	42
Licuefacción de gelatina	48
Prueba de leche con tornasol	52
Reducción de leche con azul de metileno	59
Prueba de fermentación y oxidación (O/F)	63
Prueba de ureasa	69
Prueba de Voges - Proskauer	73
Prueba de rojo de metilo	78
Reducción de nitratos	82
Prueba de fenilalanina	87
Sulfuro, indol y movilidad: SIM	92
Agar hierro triple azúcar: TSI	102
Agar lisina - hierro: LIA	112
Movilidad, indol y ornitina: MIO	116



Metabolismo	125
Producción de energía	128
Vía de degradación de las hexosas	
Glucólisis	130
Entner-Duodoroff	134
Pentosa fosfato	135
Ciclo de Krebs	139
Fermentación	142
Láctica	143
Heteroláctica	144
Alcohólica	144
Propiónica	146
Ácido mixta (fórmica)	147
De metano	148
Butilenglucolítica (acetoínica)	148
Respiración anaeróbica con aceptores inorgánicos de hidrógeno	149
Fijación de nitrógeno	149
Reducción de sulfatos	151
Métodos para el aislamiento e identificación de bacterias	
Enterobacterias	153
Coprocultivo	155
Familia Micrococaceae	157
Estafilococos	158
Streptococos	160
Urocultivo	162
Hemocultivo	163
Exudado faringeo	164
Referencias	165
Direcciones electrónicas	168



ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Figura	Referencia	Pág.
1	Morfología bacteriana	Enciclopedia Encarta, 2002	9
2	Formas de nutrición de bacterias	Enciclopedia Encarta, 2002	11
3	Reproducción bacteriana	Enciclopedia Encarta, 2002	13
4	Reproducción bacteriana: Transformación	Enciclopedia Encarta, 2002	14
5	Reproducción bacteriana: Conjugación	Enciclopedia Encarta, 2002	15
6	Superficie de placas de agar EMB que ilustra el brillo verde producido por miembros de las Enterobacterias que fermentan ávidamente lactosa: <i>Escherichia coli</i> .	Koneman, 1992	16
7	Placa de agar soya - tripticasa, inoculado con una bacteria que produce un pigmento amarillo. La producción de pigmento es una importante característica diferencial para identificar bacilos Gram negativos no fermentadores.	Koneman, 1992	18
8	Superficie de placas de agar EMB que ilustra cultivo mixto de <i>Escherichia coli</i> y <i>Shigella sp.</i>	Koneman, 1992	19
9	Morfología colonial en agar sangre.	Enciclopedia Encarta, 2002	20
10	Superficie de placas de agra EMB que ilustra el brillo verde producido por <i>Escherichia coli</i> .	Koneman, 1992	21
11	Agar BCYE	Koneman, 1992	31
12	<i>Streptococcus sp.</i>	Museum of History Natural	37
13	Pruebas bioquímicas: Fermentación de carbohidratos		38
14	Pruebas bioquímicas: Citrato		45
15	Pruebas bioquímicas: Licuefacción de gelatina		50
16	<i>Micrococcus sp</i>	Sullivan, 2002	51
17	Pruebas bioquímicas: Leche con tornasol		57
18	Pruebas bioquímicas: Leche con azul de metileno		61
19	<i>Salmonella sp.</i>	Enciclopedia Encarta, 2002	62
20	Pruebas bioquímicas: Oxidación/fermentación		66
21	Interpretación O/F		67
22	Pruebas bioquímicas: Urea		71
23	<i>Salmonella typhi</i>	Enciclopedia Encarta, 2002	72
24	Pruebas bioquímicas: Voges - Proskauer		76
25	<i>Escherichia coli</i>	Próskznki, 2002	77
26	Pruebas bioquímicas: Rojo de metilo		80
27	<i>Escherichia coli</i> , observese pili		81
28	Pruebas bioquímicas: Reducción de nitratos		85
29	Pruebas bioquímicas: Fenilalanina desaminasa		91
30	<i>Salmonella typhi</i>	University of east Anglia Norwich, 2002	96
31	Pruebas bioquímicas: SIM		99
32	<i>Salmonella typhi</i>		101
33	<i>Escherichia coli</i>	Pfeizer, 2002	101
34	Pruebas bioquímicas: TSI		107
35	<i>Salmonella sp.</i>		107
36	Fundamento: TSI	Koneman, 2002	110
37	Pruebas bioquímicas: LI A		114
38	Pruebas bioquímicas: MI O		121
39	<i>Shigella</i>	Museum of History Natural, 2002	124
40	Producción de quesos	Black, 1996	144
41	Producción de vino	Black, 1996	145

Índice de Tablas

No.	Tabla	Pág.
1	Reporte de resultados: prueba de oxidación y fermentación	68
2	Reporte de resultados: Sulfuro, indol y movilidad (SIM)	98
3	Aplicaciones: SIM	101
4	Aplicaciones: TSI	111
5	Aplicaciones: LIA	115
6	Reporte de resultados: MIO	123
7	Aplicaciones: MIO	124
8	Características bioquímicas de bacilos Gram negativos	154
9	Características bioquímicas de la Familia Micrococcaeae	157
10	Características bioquímicas de <i>Staphylococcus</i>	159
11	Características bioquímicas de <i>Streptococcus</i>	161

Índice de Esquemas

No.	Esquema	Página
1	Glucólisis	133
2	Vía de Hexosa monofosfato	138
3	Ciclo de Krebs	141
4	Coprocultivo	155
5	Aislamiento de bacterias patógenas de heces	156
6	Aislamiento de <i>Staphylococcus</i>	158
7	Urocultivo	162
8	Exudado faringeo	164



Introducción

Como estudiante la licenciatura de Q.F.B. la cual abarca en gran parte el estudio bacteriológico he observado que la mayoría de las veces, los alumnos al realizar las pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias no tienen un conocimiento real o suficiente de los principios o bases para realizarlas así como las precauciones e inconvenientes que se presentan en cada prueba bioquímica.

Para poder conocer los principios, bases bioquímicas, métodos, aplicaciones, interpretación y precauciones así como los resultados esperados en cada prueba es necesario a menudo recurrir a muchas referencias bibliográficas y publicaciones que no siempre se encuentran a disposición de los alumnos o microbiólogos en general.

En este atlas de pruebas bioquímicas se han seleccionado las pruebas que se utilizan a lo largo de la licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Por lo tanto el usuario encontrará la información suficiente y necesaria pero sobre todo, sencilla y amena de cada prueba, su principio fundamental, bases bioquímicas, medios de cultivo, reactivos empleados, resultados, interpretación, reporte de resultados, precauciones y observaciones, técnicas de inoculación y condiciones de incubación así como referencias bibliográficas. Estas han sido reunidas al final para permitir, cuando se desee una profundización acerca de un aspecto determinado de algún

tema, donde se podrá también observar diferentes imágenes de algunas especies bacterianas. En las ilustraciones a color de los resultados de cada prueba también se incluyen medios no inoculados para una mejor y mayor comparación para los lectores.

Antes de la parte dedicada a la explicación de las bases para cada prueba bioquímica se encontrarán también clasificaciones concretas y ejemplos de los medios de cultivo, así como las técnicas de inoculación más empleadas.

No se ha tratado de simplificar en exceso (pero tampoco se ha profundizado en cada prueba), sino de hacer que este atlas resulte útil especialmente para los estudiantes no solo de la licenciatura de Q.F.B., sino también para otras carreras, laboratorios de análisis clínicos y por que no, para otras instituciones.

Este atlas de colores y texto de microbiología ha sido descrito con el objeto de proporcionar a estudiantes de microbiología, tecnólogos médicos, residentes de patología y otros interesados en microbiología clínica, una introducción práctica a la identificación de laboratorio de los agentes microbianos asociados con enfermedades infecciosas y de las pruebas bioquímicas más empleadas o las mínimas necesarias para su identificación.

Bacterias

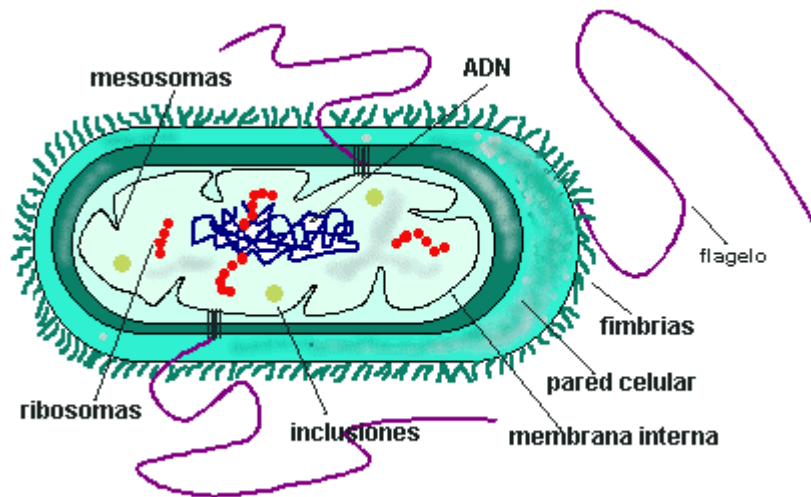


Figura 1. Morfología bacteriana

1. Morfología y estructura.

Las bacterias son microorganismos procariotas de organización muy sencilla. La célula bacteriana consta de:

- Citoplasma. Presenta un aspecto viscoso, y en su zona central aparece un nucleoide que contiene la mayor parte del ADN bacteriano, y en algunas bacterias aparecen fragmentos circulares de ADN con información genética, dispersos por el citoplasma: son los plásmidos.

- La *membrana plasmática* presenta invaginaciones, que son los *mesosomas*, donde se encuentran enzimas que intervienen en la síntesis de ATP, y los pigmentos fotosintéticos en el caso de bacterias fotosintéticas. En el citoplasma se encuentran *inclusiones* de diversa naturaleza química.
- Muchas bacterias pueden presentar *flagelos* generalmente rígidos, implantados en la membrana mediante un *corpúsculo basal*. Pueden poseer también, *fimbrias* o *pili* muy numerosos y cortos, que pueden servir como pelos sexuales para el paso de ADN de una célula a otra.
- Poseen ARN y *ribosomas* característicos, para la síntesis de proteínas.
- *Pared celular* rígida y con moléculas exclusivas de bacterias.

2. Nutrición

El éxito evolutivo de las bacterias se debe en parte a su versatilidad metabólica. Todos los mecanismos posibles de obtención de materia y energía podemos encontrarlos en las bacterias.

Según la fuente de carbono que utilizan, los seres vivos se dividen en *autótrofos*, cuya principal fuente de carbono es el CO_2 , y *heterótrofos* cuando su fuente de carbono es materia orgánica.

Por otra parte según la fuente de energía, los seres vivos pueden ser *fotoótrofos*, cuya principal fuente de energía es la luz, y los organismos *quimioótrofos*, cuya fuente de energía es un compuesto químico que se oxida.

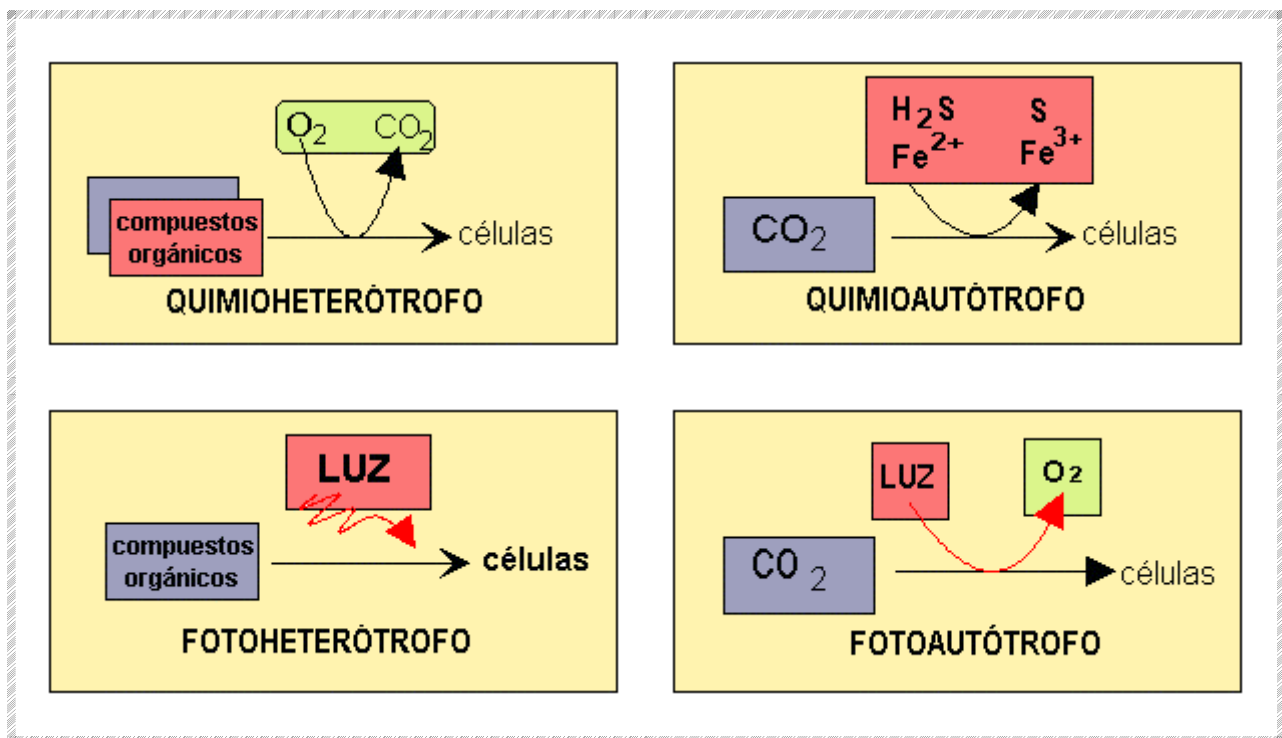


Figura 2. Formas de nutrición de las bacterias

Atendiendo a las anteriores categorías, entre las bacterias podemos encontrar las siguientes formas, como puede apreciarse en el esquema:

1. Las bacterias *quimioheterótrofas*, utilizan un compuesto químico como fuente de carbono, y a su vez, este mismo compuesto es la fuente de energía. La mayor parte de las bacterias cultivadas en laboratorios y las bacterias patógenas son de este grupo.
2. Las bacterias *quimioautótrofas*, utilizan compuestos inorgánicos reducidos como fuente de energía y el CO₂ como fuente de carbono. Como por ejemplo, *Nitrobacter* y *Thiobacillus*.
3. Las bacterias *fotoautótrofas*, utilizan la luz como fuente de energía y el CO₂ como fuente de carbono. Bacterias purpúreas.
4. Las bacterias *fotoheterótrofas*, utilizan la luz como fuente de energía y biomoléculas como fuente de carbono. Ejemplos como *Rhodospirillum* y *Chloroflexus*.

3. Reproducción

Generalmente las bacterias se reproducen por bipartición, como se ve en el siguiente esquema:

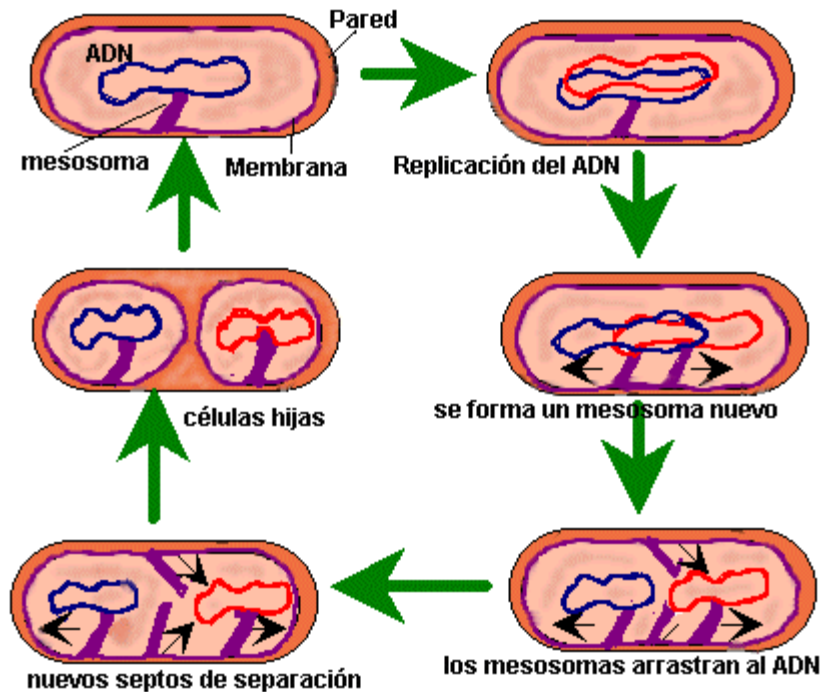


Figura 3. Reproducción bacteriana

Tras la duplicación del ADN, que esta dirigida por la ADN-polimerasa que se encuentra en los mesosomas, la pared bacteriana crece hasta formar un tabique transversal separador de las dos nuevas bacterias.

Pero además de este tipo de reproducción asexual, las bacterias poseen unos mecanismos de reproducción sexual o parasexual, mediante los cuales se intercambian fragmentos de ADN. Este tipo de reproducción puede realizarse por:

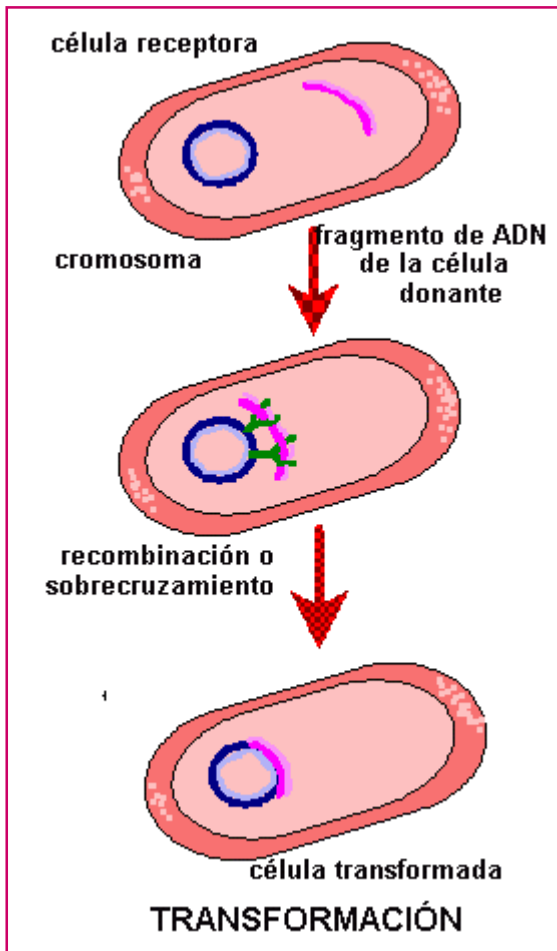


Figura 4. Reproducción bacteriana: Transformación

- TRANSFORMACION:** Consiste en el intercambio genético producido cuando una bacteria es capaz de captar fragmentos de ADN, de otra bacteria que se encuentran dispersos en el medio donde vive.

- CONJUGACIÓN:** En este proceso, una bacteria donadora F⁺ transmite a través de un puente o pili, un fragmento de ADN, a otra bacteria receptora F⁻. La bacteria que se llama F⁺ posee un plásmido, además del cromosoma bacteriano.

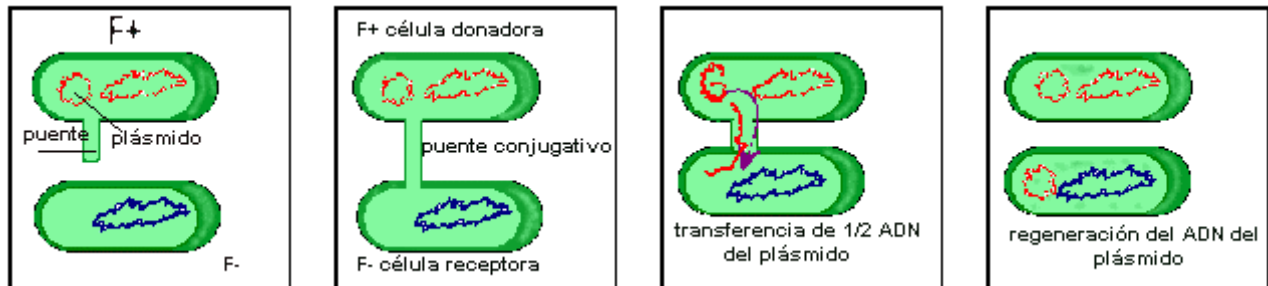


Figura 5. Reproducción bacteriana: Conjugación

- **TRANSDUCCIÓN:** En este caso la transferencia de ADN de una bacteria a otra, se realiza a través de un *virus bacteriófago*, que se comporta como un *vector intermediario* entre las dos bacterias. (Biblioteca de Consulta Microsoft® Encarta® 2002. © 1993-2001 Microsoft Corporation.)

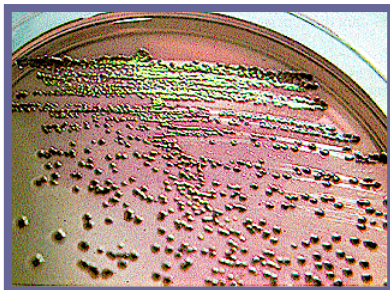
Identificación bacteriana

En la naturaleza los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas de una gran variedad de tipos diferentes. Sin embargo, el desarrollo de la microbiología se ha conseguido mediante el estudio de especies aisladas, crecidas en medios desprovistos de cualquier otra forma de vida contaminante.

Los microorganismos necesitan nutrientes apropiados así como condiciones ambientales favorables. En primer lugar el medio de cultivo debe contener aquellos nutrientes esenciales para el crecimiento de una determinada especie.

Como la mayor parte de los estudios en el laboratorio se realizan los cultivos puros (una sola especie bacteriana), se debe esterilizar el medio de cultivo y mantenerlo en condiciones estériles hasta que sea utilizado.

Medios de cultivo Medios de cultivo



Un medio de cultivo es cualquier sustancia que puede ser usada para el cultivo de microorganismos, puede ser llamada un medio o, dicho con mayor precisión un medio de cultivo.

Figura 6. Crecimiento de *Escherichia coli* en agar EMB

Los medios sirven para dos propósitos principales:

- a) Fomentar el crecimiento microbiano en forma que puedan comprobarse las características de cultivo.
- b) Facilitar algunas reacciones bioquímicas que luego puedan ser demostrables por observación directa, o bien, indirectamente por la reacción en presencia de algunos reactivos adicionales.

Todas las reacciones de cultivo así como las bioquímicas, dependen de la composición del medio y de la naturaleza del cultivo que se estudie. Los medios de cultivo se pueden clasificar en cuatro tipos diferentes:

1. Medios básicos
2. Medios enriquecidos
3. Medios selectivos, diferenciales y de enriquecimiento
4. Medios especiales

1. Medios básicos

Solo contienen algún extracto de carne u otra infusión simple, peptona, sal y agua.

El extracto o la infusión de carne proporcionan al organismo los aminoácidos, vitaminas, sales, y pequeñas cantidades de carbono, nitrógeno, hidrógeno y otros elementos.

Las sales (usualmente cloruro de sodio) sirven para obtener isotonicidad requerida para el mantenimiento de presiones osmóticas constantes.

El agua sirve como disolvente, como medio de transporte, o para ambos fines (siempre se debe usar agua destilada para preparar los medios de cultivo).

Los medios de cultivo que solo contienen extracto de carne, peptona, sal y agua, son líquidos; para el estudio de las características de las colonias es indispensable el uso de medios sólidos.

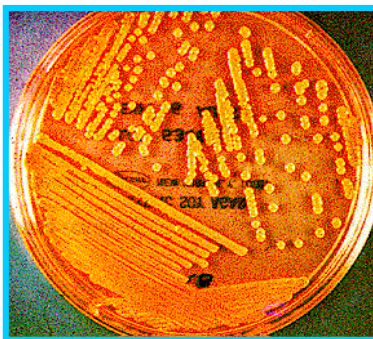


Figura 7. Agar Soya - tripticasa

La solidificación se consigue agregando agar, gelatina, albúmina de suero o de huevo, a los otros ingredientes.

Es preferible utilizar el agar, ya que es un medio sólido que no se desintegra por los medios físicos usados en el cultivo de la mayoría de los microorganismos.

Ejemplos de éste tipo de medios son los siguientes:

1. Caldo y agar nutritivo
2. Caldo de triptona y soya
3. Caldo de infusión de cerebro y corazón
4. Agar de infusión de cerebro y corazón
5. Caldo de infusión de corazón
6. Agar y extracto de hígado
7. Dextrosa de Saboraud

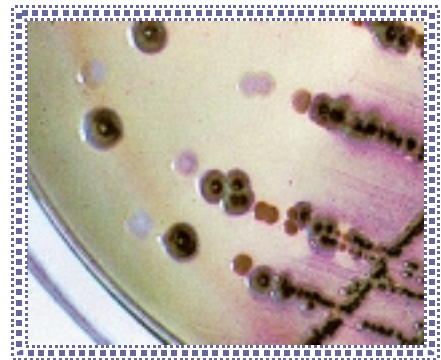


Figura 8. Agar EMB con cultivo mixto de *Escherichia coli* y *Shigella sp.*

2. Medios enriquecidos

Son aquellos medios básicos que han sido complementados con líquidos corporales, vitaminas específicas, aminoácidos, proteínas y otros nutrientes claramente definidos como tales.

Ejemplos:

1. Agar proteosa
2. Agar sangre
3. Agar chocolate
4. Caldo de suero
5. Agar con suero
6. Suero de Loeffler con sangre
7. Medios inclinados con suero
8. Agar de Bordet Gengou
9. Medio de Levinthal
10. Agar de Mueller-Hinton
11. Agar infusión de cerebro corazón
12. Agar sangre



Figura 9. Morfología colonial en Agar sangre

3. Medios selectivos, diferenciales y de enriquecimiento

Los **medios selectivos** son usualmente medios de agar básico, o enriquecidos, a los cuales se les han agregado ciertos reactivos que impiden el crecimiento de la mayoría de las bacterias, permitiendo por lo tanto el aislamiento de unas cuantas, seleccionadas en los especímenes que contengan grandes números de organismos indeseables.

Los **medios diferenciales** son medios básicos o enriquecidos, a los cuales se les han agregado ciertos reactivos que reaccionarán con algunos tipos específicos de bacterias en cierta forma observable.

Los medios de enriquecimiento son por lo general medios líquidos enriquecidos, que contienen algunas sustancias inhibidoras, con lo que se crea un ambiente especialmente favorable para límites más bien estrechos de bacterias.

Ejemplos:

1. Medio de Thayer Martin
2. Agar con feniletanol
3. Agar con sangre y bilis al 40%
4. Agar con esculina y bilis
5. Agar con sangre y telurito
6. Medio de Tinsdale modificado
7. Agar con Lowenstein Jensen en tubos inclinados
8. Agar con citrato y desoxicolato
9. Agar de sulfito de bismuto
10. Caldo selenito de sodio
11. Agar XLD (xilosa, lactosa, desoxicolato)
11. Agar sangre con azida
12. Agar con sal y manitol
13. Agar de Mc Conkey
14. Agar Salmonella - Shigella
15. Agar con eosina y azul de metileno (EMB)
16. Agar de bilis y rojo de violeta
17. Agar dextrosa y tripticaseina
18. Agar entérico Hektoen
19. Agar S-110
20. Agar tergitol 7
21. Agar verde brillante
22. Agar Vogel Jhonson
23. Agar Baird-Parker

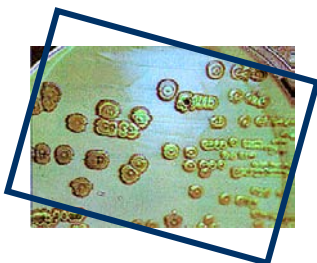


Figura 10. Crecimiento de *Escherichia coli* en Agar EMB

4. Medios especiales

Son los medios que no pueden ser fácilmente agrupados bajo alguno de los anteriores grupos.

La mayoría de ellos serán medios empleados para comprobar una o más a características bioquímicas.

Ejemplos:

Pruebas bioquímicas

1. Fermentación de carbohidratos
2. Prueba de citrato
3. Prueba de leche con tornasol
4. Reducción de leche con azul de metileno
5. Prueba de oxidación y fermentación: Hugh-Leifson (O/F)
6. Prueba de ureasa
7. Prueba de Voges – Proskauer
8. Prueba con rojo de metilo
9. Reducción de nitratos
10. Prueba de fenilalanina
11. Prueba de Sulfuro, indol, movilidad: SIM
12. Agar hierro y triple azúcar: TSI
13. Descarboxilación de la arginina y lisina: LIA
14. Descarboxilación de la ornitina: MIO

Otras clasificaciones de los medios de cultivo son las siguientes:

De acuerdo a la consistencia

1. **Medios sólidos.** Son útiles para el crecimiento, aislamiento y obtención de cultivos puros de bacterias y hongos.
2. **Medios semisólidos.** Útiles para la observación de metabolismo, así como la propagación y obtención de cultivos de bacterias anaeróbicas.
3. **Medios líquidos.** Permiten la difusión del microorganismo.

De acuerdo a la composición

1. Medios sintéticos

Es aquel en el que se conoce la composición química exacta de los ingredientes.

2. Medio no sintético

No se conoce de una manera definida la composición precisa de alguna o de todas las sustancias nutritivas.

Técnicas de inoculación

Técnicas de inoculación

El desarrollo o cosecha de microorganismos obtenido en algún medio se designa como un cultivo. Cuando las bacterias de un cultivo son todas de la misma especie, se dice que son cultivos puros; cuándo dos o más especies de bacterias se desarrollan en un medio como un cultivo mixto. Si un cultivo contiene accidentalmente más de una especie de bacterias se habla de un cultivo contaminado.

Las bacterias se cultivan en alguno de los siguientes tipos de material de vidrio, una vez limpios y esterilizados.

1. Tubos de ensayo
2. Cajas o placas de Petri
3. Matraces de Florencia y Erlenmeyer
4. Tubos de fermentación

Antes de su esterilización, un tubo que contiene medio de cultivo se tapa generalmente con algodón o con un tapón de caucho o plástico. Así se evita la entrada de nuevos contaminantes a la vez que se permite el libre intercambio de aire o gases.

Para sembrar un cultivo bacteriano en un medio estéril, un cierto número de células: "inóculo", se transfieren (se inoculan) al medio con precauciones especiales para conservar la pureza del cultivo.

En el procedimiento de inoculación el asa de cultivo o aguja de siembra, debe calentarse al rojo sobre la flama inmediatamente antes y después de hacer la transferencia. La flama destruye cualquier forma de vida sobre la superficie de la aguja o del asa. Se mantiene la aguja hacia abajo sobre la flama, para calentar la totalidad de la aguja y la parte inferior del mango.

Durante la siembra, se mantiene el tubo en la mano izquierda y se sostiene el tapón o capuchón entre los dedos meñique y anular de la mano derecha. **NO DEBE NUNCA DEPOSITARSE EL TAPÓN** sobre la mesa. Mantener el tubo lo más cerca posible de la flama durante la siembra. Las bocas de los tubos de donde tomamos los cultivos y las de aquellos donde van a ser transferidos deben también flamearse inmediatamente antes y después de que la aguja sea introducida y sacada. Además de destruir cualquier organismo del borde del tubo, la flama tiende a crear corrientes de convección hacia fuera, decreciendo así el riesgo de contaminación.

Después de inocular, un cultivo bacteriano se conserva o se incuba en un lugar apropiado para el crecimiento. En este caso "crecimiento", significa el desarrollo de una población de células a partir de una o pocas células. La masa de las células hijas llega a ser visible a simple vista, bien como una opacidad "enturbamiento", en medio líquido; o como una población aislada "colonia" en medio sólido, donde el aspecto de éstas ofrece un medio para diferenciar especies.

La inoculación primaria puede hacerse con un asa, hisopo u otros dispositivos adecuados.

➤ Diseminación en placas:

a) Estría

- 1 Cruzada
- 2 En Z
- 3 Simple (en ángulos rectos)
- 4 Masiva

b) Vaciado en placa

En el caso de la estría cruzada el inóculo se disemina con un movimiento hacia atrás y hacia delante en cada cuadrante girando la placa a 90°. El asa o alambre debe esterilizarse en cada diseminación entre cada cuadrante.

El propósito de esta técnica consiste en diluir el inóculo en forma suficiente en la superficie del agar para que sea posible obtener colonias.

El método de dilución o vaciado en placa proporciona por lo general placas con un número apropiado de colonias, y se basa en una dilución aproximadamente cuantitativa de la muestra original en un medio sólido.

Una técnica muy común en medicina consiste en obtener especies de microorganismos en un aplicador de algodón (hisopo). Si se utiliza el aplicador infectado para sembrar directamente en caja petri se obtiene una mezcla compleja de organismos sin ninguna colonia aislada, lo cual no reporta ningún beneficio. Para resolver esto existe una técnica que permite aislar una colonia pura de un algodón infectado, para lo cual; debe trazar con el hisopo unas líneas, inoculando una pequeña zona en el borde de una placa. Cubra la caja y queme el aplicador en el mechero. Esterilice el asa y pásela en el sector inoculado con el algodón para recoger algunas bacterias, luego inocule con ellos la otra zona en la misma caja (estría cruzada).

➤ **Inoculación de medios semisólidos en tubo**

Por picadura en forma vertical

La inoculación de este tipo de medios se describe en el Atlas interactivo.

El agar inclinado es un tubo conteniendo un medio con agar que, durante su enfriamiento, se colocó inclinado. El contenido de un tubo así inclinado constituye un medio adecuado para el desarrollo de bacterias, especialmente de aerobias y anaerobias facultativas. Algunas características de los cultivos, como la formación de pigmentos se observan más fácilmente sobre cultivos inclinados.

Cuando se inocula agar semisólido en un tubo para pruebas de motilidad (aunque no sea la única prueba que se valora), es importante que el asa de inoculación sea retirada a lo largo del mismo camino que se usó para atravesar inicialmente el medio. Solo se pica el agar con un movimiento uniforme y recto y para ello se utiliza el asa recta.

➤ Inoculación de medios líquidos (tubo)

El crecimiento bacteriano en medios líquidos se observa de la siguiente manera:

1. Enturbamiento, opacidad más o menos densa.
2. Formación de velo, pequeña masa de células que flotan en la parte superior del cultivo.
3. Sedimento, depósito de células que permanece en la parte inferior del cultivo, pero que se pone nuevamente en suspensión si el tubo se sacude suavemente.

Difusión

Los medios líquidos pueden inocularse como en el método ilustrado (Atlas interactivo); el tubo debe inclinarse aproximadamente 30° , con un asa de inoculación se toca la superficie interna del vidrio, exactamente por encima del punto donde la superficie del medio forma un ángulo agudo. Se debe utilizar el asa con arillo.

Posteriormente se vuelve a colocar el tubo en posición recta, así el área de inoculación queda sumergida en el medio.

Agitar suavemente cada tubo. No dejar que el líquido salpique la tapa del tubo. Por lo común es suficiente un solo inóculo para inocular una batería de 8 a 10 tubos.

Cuando se inocular una batería con una misma especie de bacteria no hay necesidad de pasar por la llama entre cada inoculación.

Cuando se utiliza una aguja o asa para inocular una batería con un solo inóculo, el traspaso de azúcares de un tubo a otro es tan infinito que no hay problema de que un tubo contenga una mezcla de carbohidratos.

Cuando se inocular una batería no es necesario observar en forma apreciable el inóculo en cada uno de los tubos. Un solo inóculo espeso tomado de cultivo contiene millones de bacterias que son suficientes para inocular cada tubo con un número apreciable de bacterias necesarias para que se produzca el metabolismo.

- Inoculación de medios sólidos (tubo): Pico de flauta o cola de pescado
 - a) Por punción (picadura)
 - b) Por estría
 - c) Por punción y estría

Los picos de flauta (planos inclinados) de agar se inoculan de la siguiente forma: primero se atraviesa todo el fondo del agar con el asa recta de inoculación, esto cuando sea necesario ya que no todos los medios lo requieren, posteriormente éste se retira con un movimiento en S a través del agar que se disemina el inóculo. Se utiliza el asa recta.

Incubación de medios Incubación de medios

Las temperaturas óptimas de incubación de las bacterias son diferentes. En laboratorios pequeños donde es probable que los recursos sean limitados, puede no ser posible proporcionar todas las temperaturas óptimas para el crecimiento de la totalidad de los aislamientos clínicos. La mayoría de los microorganismos utilizados en el laboratorio así como los aislados de muestra clínicas crecen a una temperatura de 35° C, por ende se debe mantener la incubadora a 35 – 37° C.

El crecimiento de muchas bacterias se incrementa con una atmósfera de 5-7 % de CO₂. Si solo se dispone de una incubadora con aire ambiente sin CO₂ los tubos y placas para cultivos pueden colocarse en una jarra con una vela encendida y cerrar lo mejor posible la jarra.

Morfología colonial

Morfología colonial

La interpretación de los cultivos primarios después de 24 - 48 horas de la incubación requiere de la observación o análisis de la morfología colonial. La evaluación debe ser de la siguiente forma:

1. Observar las características y el número relativo de cada tipo de colonia recuperado en medios de agar.

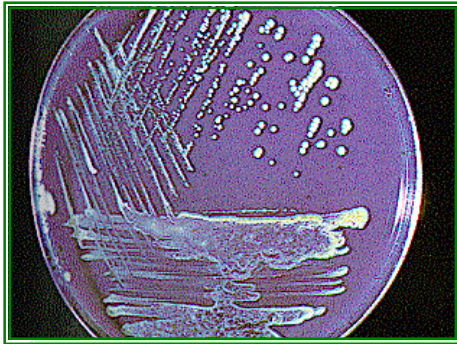


Figura 11. Agar BCYE

2. Determinar la pureza, coloración de Gram y morfología de las bacterias en cada tipo de colonia.

3. Observar cambios en el medio que rodea las colonias, que reflejan actividades metabólicas específicas de las bacterias recuperadas.

La evaluación de las características macroscópicas de las colonias habitualmente se lleva a cabo por medio de la inspección visual del crecimiento en la superficie de las placas de agar.

La interpretación de los cultivos primarios se lleva a cabo sosteniendo la placa en la mano y observando la superficie del agar en busca de crecimiento bacteriano.

Colonias puntiformes de bacterias que crecen lentamente, pueden pasarse por alto entre colonias más grandes en particular si el crecimiento tiene tendencia a diseminarse sobre la superficie de la placa.

Durante el examen las placas deben inclinarse en diversas direcciones, con una iluminación directa brillante, de modo que la luz se refleje desde varios ángulos. Las placas de agar sangre también deben examinarse con transiluminación con una luz brillante desde detrás de la placa para detectar reacciones hemolíticas en el agar.

La morfología de las colonias es una de las características básicas de las bacterias y es indispensable para la identificación preliminar.

El tamaño de las colonias bacterianas es asumiendo condiciones de cultivo favorables bastante uniforme de toda una especie.

La forma de la colonia viene determinada por su borde y su espesor. El borde puede ser liso o irregular y aserrado. Cuando el grosor es mucho mayor en el centro, disminuyendo uniformemente hacia el borde, se dice que la colonia es elevada.

La consistencia y textura de la masa celular también son rasgos distintivos de la morfología de las colonias. Pueden tener una consistencia desde seca y frágil a grasienta y cremosa, o viscosa y pegajosa.

La consistencia viscosa de la colonia es propia de las bacterias que tienen cápsulas. La superficie de la colonia puede ser uniforme, lisa y brillante, rugosa y granular, o estriada y dentada. Al examinarla con luz transmitida, la masa celular puede parecer de una textura amorfa o granular, y variar desde casi completamente translúcida, quizá con un tinte azulado pasando por varios grados de opalescencia, hasta un color blanco o una opacidad amarillenta.

No todas las colonias bacterianas son pigmentadas: la pigmentación es más frecuente entre las bacterias atróficas. Debido a que la mayor parte de los pigmentos son sustancias carotenoides, las células pueden aparecer de color rojo, naranja o amarillo.

La diferenciación con un criterio morfológico de las colonias es sólo orientativa, y para poder identificar una bacteria se necesita un estudio detallado de sus características fisiológicas e inmunológicas.

Lectura de morfología colonial

- ❖ Tamaño: diámetro en mm.
- ❖ Forma: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide.
- ❖ Elevación: plana, sobre elevada, convexa, pulvonada, umbonada, umbilicada.
- ❖ Margen (borde): entero, ondulante, lobulado, lacerado, filamentoso, rizado.
- ❖ Color: blanco, amarillo, negro, naranja, etc.
- ❖ Superficie: brillante, opaca, erizada, rugosa.
- ❖ Transmisión de luz: opaca, translúcida, transparente.
- ❖ Consistencia: cremosa, seca, mucoide (viscosa), membranosa).

IDENTIFICACIÓN BASADA EN CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS

La mayor parte de las pruebas usadas para evaluar la actividad bioquímica o metabólica de bacterias (por medio de la cual puede hacerse una identificación final de especie), se lleva a cabo mediante el subcultivo del aislamiento primario en una serie de medios diferenciales, cuyos resultados pueden interpretarse después de uno o dos días de incubación.

1. FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS

❖ Medio de cultivo: Caldo básico rojo de fenol

Composición:

- a) Peptona 10g.
- b) Extracto de carne 1g.
- c) Cloruro de sodio 5g
- d) Agua destilada 1000 ml.
- e) Indicador de pH: Rojo de fenol
 - Ácido: Color amarillo (pH = 6.8)
 - Alcalino : Color rojo (pH = 8.4)
 - Medio no inoculado: Rojo (pH = 7.4)

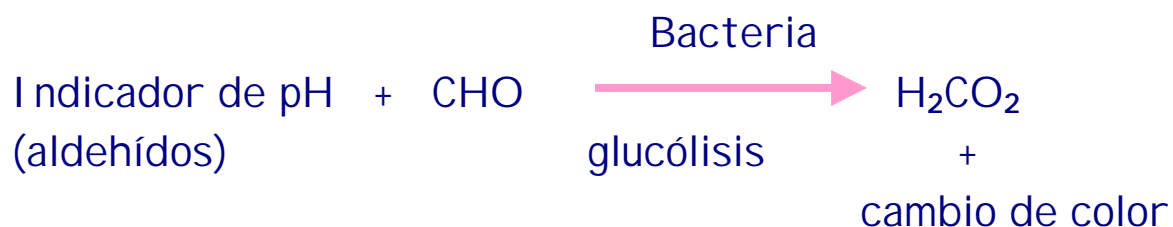
❖ Fundamento

La fermentación es un proceso metabólico de oxido-reducción que ocurre en un medio ambiente anaerobio y, en lugar de oxígeno, un sustrato orgánico sirve como el aceptor final de hidrógeno (electrones). En los sistemas de prueba bacteriológicos, este proceso se detecta observando cambios de color en indicadores de pH a medida que se forman productos ácidos.

Las bacterias que fermentan un hidrato de carbono son por lo general anaerobios facultativos. Por medio del proceso de fermentación un hidrato de carbono es degradado y descompuesto en dos moléculas de carbono (triosas) que son nuevamente degradadas en un número de compuestos de 1, 2, 3 y 4 carbonos. Los productos finales varían con cada especie bacteriana y depende del sistema enzimático existente en la especie y las condiciones del medio ambiente.

El más importante ciclo fermentativo de la degradación de la glucosa es el ciclo de Embden - Meyerhof aun cuando éste también puede producirse por la derivación de pentosa o el ciclo de Entner - Duodoroff. Pueden utilizarse diversos hidratos de carbono. La bacteria usada depende de las dificultades que se presenten para identificar un organismo determinado.

Utilizando un indicador de pH con un determinado hidrato de carbono puede determinarse si una bacteria ha degradado el mismo en varios productos terminales, observando un cambio de color visible en el medio.



❖ Consistencia del medio

Líquido

❖ Inoculación

Por difusión, inóculo denso

❖ Condiciones de incubación



Figura 12. *Streptococcus*

Tiempo: 24 - 48 horas

Temperatura: 35 - 37° C

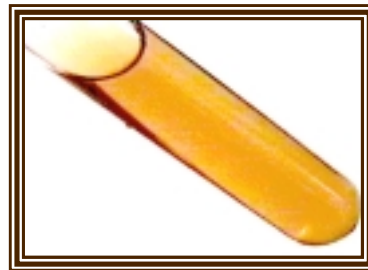
❖ Resultados



MEDIO NO INOCULADO



NEGATIVO



POSITIVO

Figura 13. Pruebas bioquímicas de Fermentación de Carbohidratos

❖ Interpretación

Positiva = Color amarillo (ácido)

Negativa = Color rosa - rojizo (alcalina)
Color naranja

❖ Observaciones

Existen ocasiones que con algunas especies de bacterias es necesaria la incubación más prolongada, esto se recomienda cuando aparece un color naranja, se incuban bajo las mismas condiciones 24 horas más. Sí aun así se presenta este color la prueba se reporta como negativa ya que lo más probable es que el microorganismo esté formando productos metabólicos que no necesariamente son por fermentación por ello no alcanza el color rojo esperado.

El hecho de incubar por 24 horas más es poco práctico ya que la mayor parte de las ocasiones se tiene el tiempo necesario para la incubación de 24 horas, por ello en este manual se considera que la prueba se tome como negativa si presenta un color naranja.

❖ Reporte de resultados

A = ácido

K = alcalino

G = gas

❖ Aplicaciones

❖ Microorganismos fermentadores de carbohidratos:

- Fermentadores de glucosa: Todos los miembros de las Enterobacteriaceae.
- Fermentadores de glucosa y lactosa: *Escherichia coli*, *Klebsiella* y grupos *Enterobacter*.
- Fermentadores de manitol: *Staphylococcus aureus*
- Fermentadores de inositol: *Proteus rettgeri*
- Fermentadores de lactosa: *Neisseria lactamica*
- Fermentadores de adonitol: *Providencia alcaligenes*.
- Fermentadores de inulina: *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus sanguis*.
- Fermentadores de sacarosa: *Yersinia enterocolitica*.
- Fermentadores de salicina: *Listeria monocytogenes*.

❖ Microorganismos no fermentadores de Carbohidratos:

- No fermentadores de lactosa: Enterobacterias patógenas como *Salmonella* y *Shigella*.
- No fermentadores de manitol: *Staphylococcus epidermidis*.
- No fermentadores de salicina: Especies de *Corynebacterium*.
- No fermentadores de rafinosa: Otras especies de *Aeromonas*.
- No fermentadores de inositol: *Proteus morganii*.
- No fermentadores de adonitol: *Providencia stuartii*.
- No fermentadores de inulina: *Streptococcus* del grupo D.
- No fermentadores de sacarosa: Otras especies de *Yersinia*.

2. PRUEBA DE CITRATO

❖ Medio de cultivo: Citrato de Simmons

Composición:

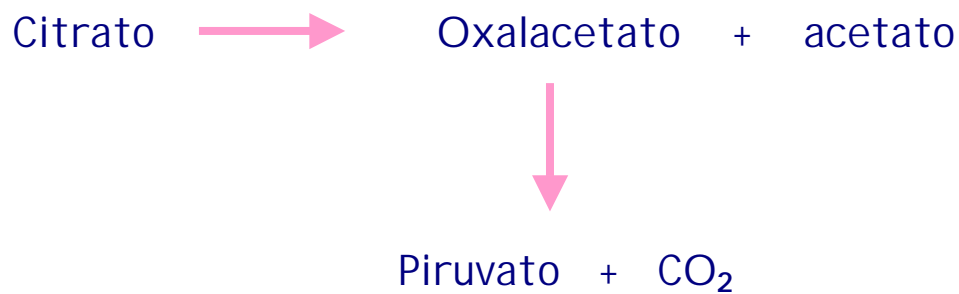
- a) Sulfato de magnesio
- b) Monofosfato de amonio
- c) Fosfato dipotásico
- d) Citrato de sodio
- e) Cloruro de sodio
- f) Agar
- g) Agua destilada
- h) Indicador de pH: Azul de bromotimol (pH= 6)
 - Alcalino: color azul de Prusia intenso (pH = 7.6)
 - Medio no inoculado: Color verde (pH = 6.9)

❖ Fundamento

Determina si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento, provocando alcalinidad.

El medio incluye citrato de sodio, un anión como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno.

Normalmente el metabolismo del citrato comprende una condensación de acetilo con la coenzima A y oxalacetato para entrar en el ciclo de Krebs. El desdoblamiento del citrato comprende un sistema enzimático sin la intervención de la coenzima A. Esta enzima se denomina **citritasa o citrato desmolasa**.



Los productos obtenidos del metabolismo del citrato dependen del pH del medio:

pH básico:



pH ácido:



❖ Consistencia del medio

Sólido inclinado (pico de flauta)

❖ Inoculación

Se toma una colonia bien aislada de la superficie del medio de aislamiento primario y se inoculara como una estría única en la superficie del pico de flauta.

❖ Incubación

Tiempo = 24 - 48 horas

Temperatura = 35 - 37° C

❖ Precauciones

El inóculo debe ser liviano.

Sí éste es demasiado grande, compuestos orgánicos preformados dentro de la pared celular de las bacterias que están muriendo pueden liberar suficiente carbono y nitrógeno como para dar un resultado falso – positivo.

Cuando se inocula una serie de tubos de medios de cultivo diferenciales con un microorganismo desconocido, es importante sembrar primero el medio citratado para prevenir el arrastre de proteínas o carbohidratos de los otros medios, aunque se supone se esteriliza el asa en cada inoculación.

❖ Resultados



MEDIO NO INOCULADO



NEGATIVO



POSITIVO



POSITIVO



POSITIVO

Figura 14. Pruebas bioquímicas de citrato

❖ Interpretación

Positivo: Crecimiento aunque no exista cambio de color.
Crecimiento y el medio de color azul intenso en
pico de flauta.

Negativo: No se observa crecimiento y medio de color
verde.

Si se utiliza carbono a partir de citrato de sodio, también se extrae nitrógeno del fosfato de amonio contenido en el medio, liberándose amoníaco. En ocasiones se detecta un crecimiento visible a lo largo de la línea de siembra antes de la aparición de color. Este crecimiento visible también indica resultado positivo.

❖ Reporte de resultados

Negativo (-)

Positivo (+)

❖ Aplicaciones

❖ Microorganismos positivos

Especies de:

- *Salmonella*
- *Arizona*
- *Citrobacter*
- *Enterobacter*
- *Klebsiella*
- *Serratia licuefaciens*
- *Pseudomonas cepacia*

❖ Microorganismos negativos

- *Edwarsiella*
- *Yersinia enterocolítica*
- *Escherichia coli*
- *Shigella*
- *Yersinia pseudotuberculosis*
- Otras especies de *Moraxella*
- *Proteus morganii*

3. PRUEBA DE LICUEFACCIÓN DE GELATINA

❖ Medio de cultivo: Gelatina nutritiva

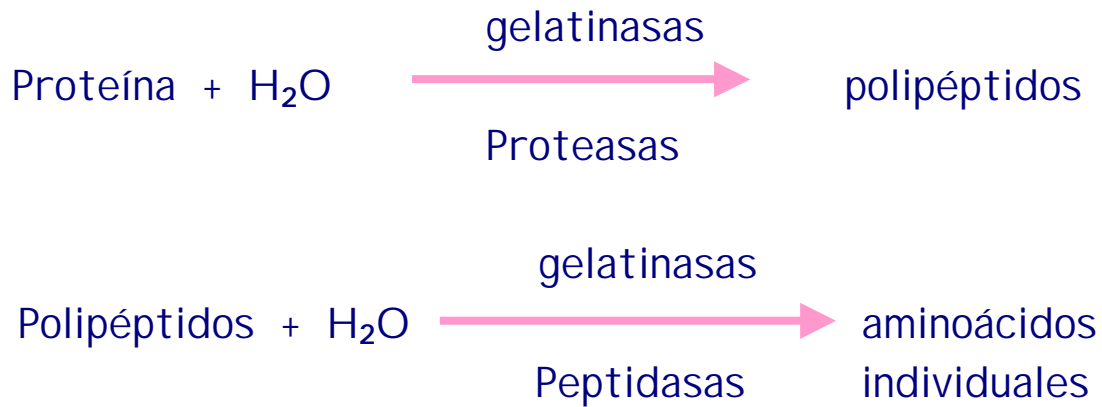
Composición:

- a) Extracto de carne
- b) Peptona
- c) Gelatina
- d) Agua destilada

❖ Fundamento

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

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 exonucleares de tipo protelítico, gelatinasas, son secretadas por ciertas bacterias para desdoblar a las proteínas y esta capacidad ayuda a la identificación bacteriana.



❖ Consistencia del medio

Semisólido

❖ Inoculación

Picadura en posición vertical hasta una profundidad de 2 - 2.5 cm, inóculo denso.

❖ Condiciones de incubación

Tiempo: 18 - 24 horas

Temperatura: 35 - 37 ° C

Al término de la incubación se coloca el tubo en un refrigerador o baño de hielo durante dos horas para determinar si se ha producido o no la digestión de la gelatina (licuefacción).

❖ Resultados



**MEDIO NO
INOCULADO**



NEGATIVO



POSITIVO

Figura 15. Pruebas bioquímicas de licuefacción de gelatina

❖ Interpretación

Positivo: Medio licuado (estado líquido)

Negativo: Medio sólido

El medio de gelatina nutritiva para punción no es conveniente para las pruebas de rutina de la actividad de la gelatinasa, dado que muchas especies requieren una incubación prolongada antes de que aparezcan muestras de licuefacción. En los métodos diagnósticos de rutina para identificar bacterias, la duración de la incubación deberá alcanzar un periodo razonable.

❖ Reporte de resultados

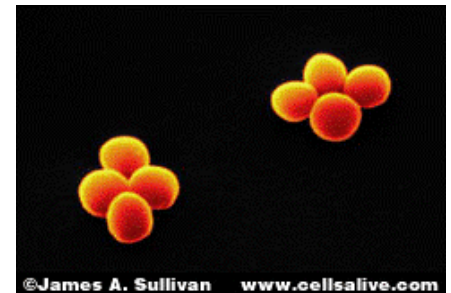
Positivo (+)

Negativo (-)

❖ Aplicaciones

❖ Microorganismos positivos

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis* (lenta)
- *Serratia liquefaciens*
- *Serratia marcescens*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- Especies de *Flavobacterium*



❖ Microorganismos negativos **Figura 16. *Micrococcus***

- *Listeria monocytogenes*

4. PRUEBA DE LA LECHE CON TORNASOL

❖ Medio de cultivo: Medio de leche tornasolada

Composición:

- a) Leche descremada
- b) Agua destilada
- c) Indicador de pH: Tornasol
 - Ácido: Color rojo (pH = 4.5)
 - Alcalino: Color azul (pH = 8.3)
 - Medio no inoculado: Azul purpúreo (pH = 6.8)

❖ Fundamento

Permite diferenciar organismos sobre la base de sus múltiples reacciones metabólicas en un medio lácteo como: fermentación de lactosa, caseólisis, y coagulación de la caseína. El tornasol incorporado a la leche es un indicador de pH y de oxidación-reducción que hace que el medio pueda indicar diversas funciones metabólicas. La leche contiene lactosa, caseína, lactalbúmina y lactoglobulina, por lo tanto, un organismo puede mostrar una o varias propiedades metabólicas en la leche tornasolada ayudando así a la identificación bacteriana:

1. Fermentación de lactosa
2. Reducción del tornasol
3. Formación de coágulo
4. Peptonización (digestión)
5. Formación de gas

1. Fermentación de lactosa

Cuando un organismo es capaz de fermentar lactosa, produce principalmente ácido láctico, con una condición ácida indicada por el cambio de color del medio que se vuelve rojo rosado. A veces el ácido butírico es el producto final.

Ciertas bacterias que forman álcalis no fermentan lactosa, pero actúan sobre las sustancias nitrogenadas que se encuentran en la leche liberando amoníaco, y dando en consecuencia un pH alcalino que se manifiesta por un color púrpura azulado.



2. Reducción del tornasol

El tornasol es un indicador de pH y un indicador de oxidación reducción; algunos organismos son capaces de reducir el tornasol a una leucobase.

3. Formación de coágulo

Las enzimas **proteolíticas** provocan la hidrólisis de las proteínas de la leche lo que da como resultado su coagulación. La principal enzima responsable de la formación de coágulo es la **renina**.

La formación del coágulo es causada por la precipitación de la caseína, por la formación de ácidos o por la conversión de la caseína en paracaseína por la enzima **renina**. La caseína es una fosfoproteína compleja y es la proteína más importante de la leche.

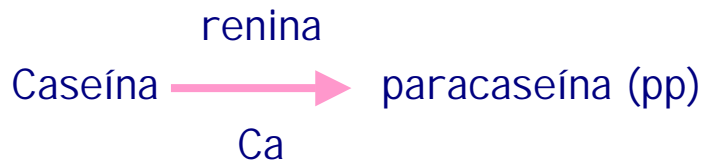
Formación de un coágulo ácido

La precipitación de la caseína provocada por los ácidos orgánicos a partir de lactosa en condiciones ácidas produce un coágulo firme y gelatinoso que no se separa de las paredes del tubo.



Formación del coágulo

Otra forma de coágulo es el coajo, o sea el proceso de coajado de la leche por la conversión de la caseína en paracaseína por las enzimas renina, pepsina o quimiotripsina contenidas en la leche. La **renina** provoca el cuajado de la leche convirtiendo la sal de caseína soluble en una paracaseína insoluble que es el cuajo o requesón.



4. Peptonización (digestión)

La hidrólisis de la caseína por la actividad enzimática produce una conversión final del precipitado caseinógeno en un líquido claro; el proceso se denomina peptonización y se manifiesta por una aclaración acuosa del medio causada por una digestión del precipitado (coágulo) y las proteínas de la leche por las enzimas proteolíticas de las bacterias. Sin embargo, solo se produce una peptonización cuando la bacteria que se desarrolla en la leche tornasolada contiene la enzima proteolítica caseinasa.

5. Formación de gas

Los gases CO_2 y H_2 se forman como resultado final de la fermentación de la lactosa.

❖ Consistencia del medio

Líquido

❖ Inoculación

Difusión

❖ Condiciones de incubación

Tiempo: 18-48 horas

Temperatura: 35 - 37° C

❖ Resultados

Figura 17. Pruebas bioquímicas de leche con tornasol



❖ Interpretación

Rojo rosado: ácido; fermentación de lactosa

Azul purpúreo: No fermentación de lactosa; sin cambio del indicador de pH.

Azul: Alcalino; Ausencia fermentación de lactosa. El organismo ataca las sustancias nitrogenadas que se encuentran en el medio.

Blanco: Reducción del tornasol a una leucobase.

Formación de coágulo: Coagulación de la proteína de la leche.

Aclaración del medio: Digestión; se ha ingerido la proteína de la leche.

Gas: Producción de burbujas en la campana de Durham.

❖ Reporte de resultados

En la tabla de resultados solo se escribirán las letras que aparecen dentro del paréntesis.

Rojo rosado (A)

Azul purpúreo (SC)

Azul (K)

Blanco (Red)

Coágulo (C)

Digestión (D)

Gas (G)

❖ Aplicaciones

Ayuda a la diferenciación de especies sobre todo del género *Clostridium*.

Sin crecimiento:

- *Clostridium cochlearium*
- *C. difficile*
- *C. putrefaciens*
- *C. tetanomorphum*
- *Streptococcus equinus*

Con crecimiento:

- *Streptococcus bovis*

5. PRUEBA DE REDUCCIÓN DE LA LECHE CON AZUL DE METILENO

❖ Medio de cultivo: Medio de leche con azul de metileno

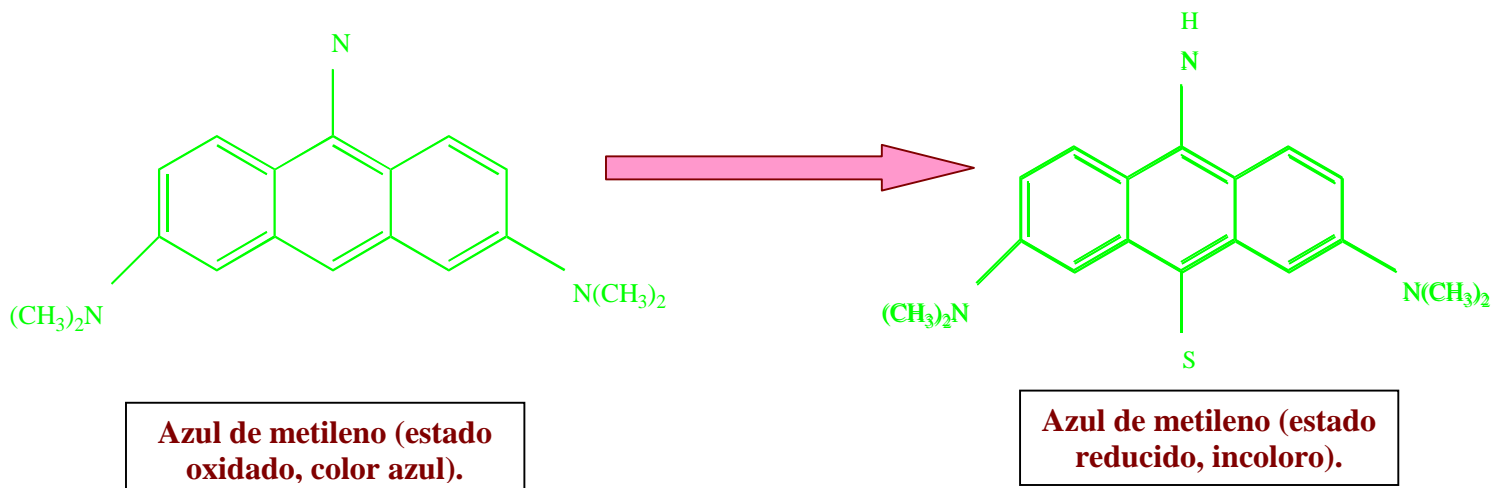
Composición:

- a) Leche descremada deshidratada
- b) Agua destilada
- c) Indicador : Azul de metileno
 - Incoloro : Estado reducido
 - Azul : Estado oxidado; medio no inoculado (pH=6.4)

❖ Fundamento

Permite diferenciar organismos por su capacidad de reducir el azul de metileno en un medio con leche. El sistema citocromo oxidasa activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular que a su vez actúa como un aceptor de electrones en el periodo terminal del sistema de transferencia de electrones. Cuando existen condiciones aeróbicas el oxígeno es el aceptor final del hidrógeno, produciendo agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana y su sistema enzimático.

Los sustratos artificiales como el azul de metileno, pueden sustituir a los aceptores de electrones naturales en cualquier lugar de la cadena de transporte de electrones, donde actúan como reductores del sistema citocromo. Cuando se agrega el colorante sintético reducible, azul de metileno a un medio que contenga organismos metabolizantes, los electrones producidos por un sustrato oxidable son desplazados de su ciclo normal, si se produce **reductasa** y son utilizados para reducir el colorante.



❖ Consistencia del medio

Líquido

❖ Inoculación

Difusión, inóculo denso

❖ Condiciones de incubación

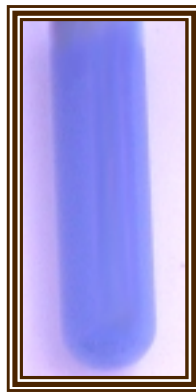
Tiempo: 18-24 horas

Temperatura: 35 - 37° C

❖ Resultados



**MEDIO NO
INOCULADO**



NEGATIVO



POSITIVO

Figura 18. Pruebas bioquímicas de leche con azul de metileno

❖ Interpretación

Positiva: Incoloro; reducción

Negativa: Azul; no hay reducción

❖ Reporte de resultados

R = Reducción

(-) = Negativo, sin cambio de color

❖ Aplicaciones

Esta capacidad enzimática se utiliza fundamentalmente para diferenciar los enterococos (especies de *Streptococcus* del grupo D) de otros miembros del género *Streptococcus*.

❖ Microorganismos positivos

Enterococos (*Streptococcus* del grupo D)

❖ Microorganismos negativos

Especies de *Streptococcus* que por lo general no son enterococos.

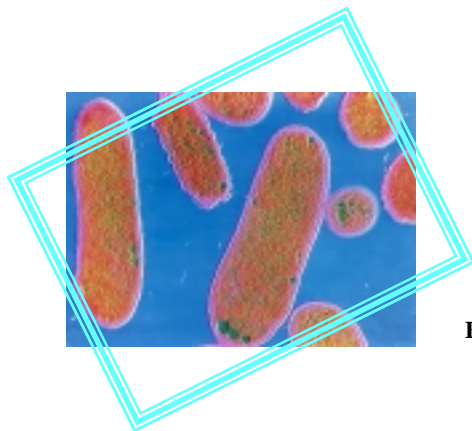


Figura 19. *Salmonella*

6. PRUEBA DE OXIDACIÓN FERMENTACIÓN

❖ Medio de cultivo: Medio básico de Hugh Leifson, medio O/F.

Componentes:

- a) Peptona
- b) Cloruro de sodio
- c) Fosfato de potasio
- d) Hidratos de carbono (glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa).
- e) Agar
- f) Agua destilada
- g) Indicador de pH: Azul de bromotimol
 - Ácido : Color amarillo (pH = 6)
 - Alcalino : Azul de Prusia intenso (pH = 7.6)
 - Medio no inoculado: Verde (pH = 7.1)

Se deben tener dos tubos para esta prueba uno sin sello y otro con sello de parafina.

❖ Fundamento

Determina el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono.

La utilización que una bacteria hace de los hidratos de carbono tiene lugar por alguno de dos procesos: de fermentación o de oxidación. Algunas bacterias son capaces de metabolizar un carbohidrato solo en condiciones aeróbicas, mientras que otras producen ácido tanto aeróbica como anaeróbicamente. La diferencia principal entre el metabolismo fermentativo y oxidativo depende de los requerimientos de oxígeno atmosférico y de la fosforilación inicial. La fermentación es un proceso anaeróbico que requiere la fosforilación inicial de la glucosa previamente a su degradación, mientras que la oxidación, en ausencia de compuestos inorgánicos como nitrato y sulfato, es un proceso estrictamente aeróbico que comprende la oxidación directa de una molécula de glucosa no fosforilada (inicialmente). La fermentación produce una acidez más elevada que el proceso metabólico oxidativo.

El medio OF contiene una elevada concentración de carbohidratos con una baja concentración de peptona, produciendo así una condición alcalina que neutraliza la más ligera acidez producida por un organismo oxidativo. El fosfato de potasio agregado al medio favorece la fermentación y actúa como buffer para controlar el pH. La concentración de agar empleado permite también la determinación de la movilidad y ayuda a la distribución por todo el tubo del ácido producido en la superficie del medio.

Son necesarios dos tubos de cada medio de hidratos de carbono para la prueba. El medio en un tubo se expone al aire, el otro se cubre con aceite mineral o parafina líquida estériles. Las bacterias oxidativas producen ácidos solo en el tubo abierto expuesto al oxígeno atmosférico; los microorganismos fermentadores producen ácidos en ambos tubos; y las bacterias no sacarolíticas son inertes en este medio, que permanece con un pH alcalino después de la incubación.

La prueba OF tiene algunas limitaciones; los bacilos no fermentadores de crecimiento lento pueden no producir cambios de color durante varios días, y especies que son particularmente activas sobre aminoácidos pueden hacer que reacciones ácidas débiles reviertan con el tiempo, confundiendo la interpretación final.

❖ Consistencia del medio

Semisólido (también permite la observación de movilidad).

❖ Inoculación

Picadura, inóculo poco denso. Picar ambos tubos aproximadamente hasta 0.6 mm de fondo.

❖ Condiciones de incubación:

Tiempo: 18 - 24 horas

Temperatura: 35-37° C

❖ Resultados



Figura 20. Pruebas bioquímicas de Oxidación / Fermentación

❖ Interpretación

Amarillo: ácido
Burbujas: Gas
Verde: alcalino

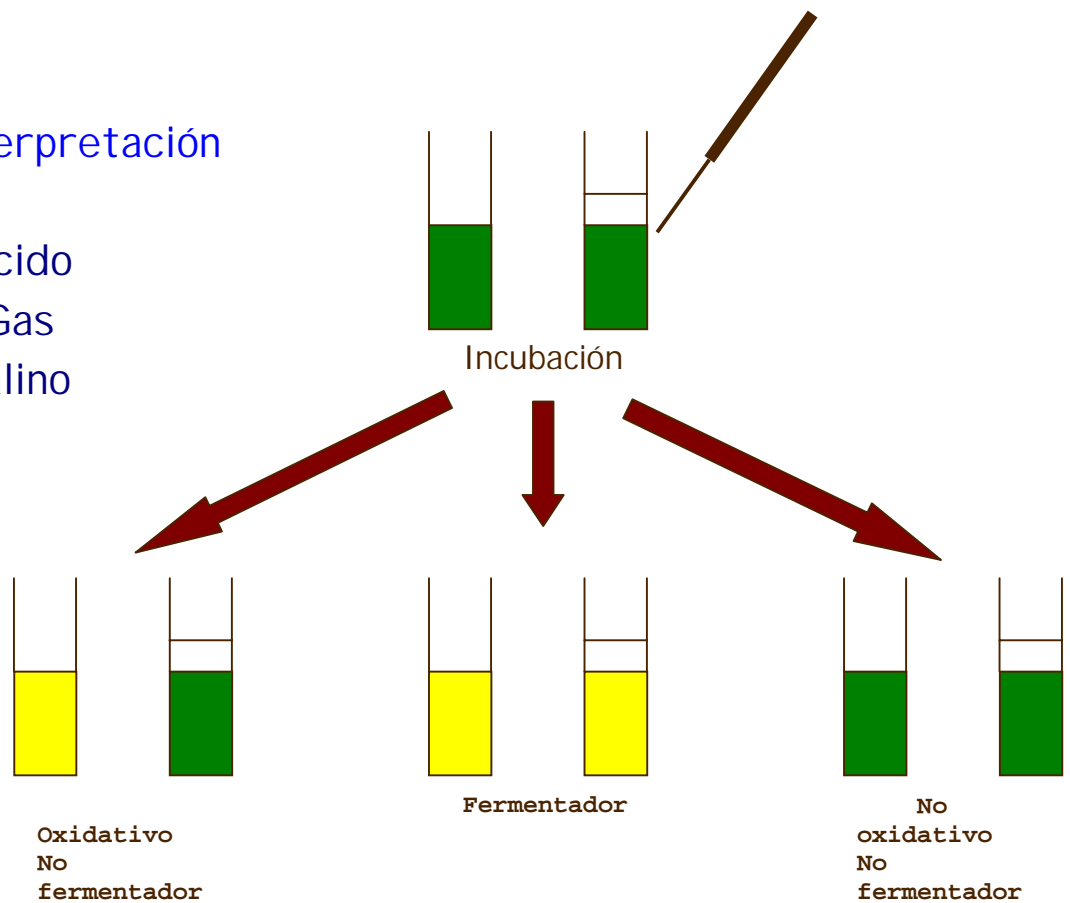


Figura 21. Diagrama de interpretación de la prueba de Oxidación / Fermentación

❖ Aplicaciones

1. Fundamentalmente para diferenciar géneros intestinales no entéricos, Gram negativos de la Familia Enterobacteriaceae.

2. Ayuda a la diferenciación entre los géneros de la Familia Micrococcaceae.

- *Micrococcus* oxida glucosa
- *Staphylococcus* fermentan glucosa

3. Ayuda a la identificación de Enterobacterias

Fermentadoras de glucosa: *Escherichia coli*

Oxidativas de glucosa: *Pseudomonas aeruginosa*

No sacarolítico: Especies de *Moraxella*

❖ Reporte de resultados

Metabolismo	Tubo c/reacción	Tubo sin sello	Tubo con sello
Oxidación (O)	<i>Abierto</i>	<i>Amarillo (A)</i>	<i>Verde (-)</i>
Fermentación (F)	Cubierto	Amarillo (A)	Amarillo (A)
Fermentación (F)	Cubierto	Amarillo (AG)	Amarillo (AG)
Ni fermentación ni oxidación (-)	Ninguno	Azul o verde (-)	Verde (-)
Fermentación y oxidación (O+F)	Ambos	Amarillo (A ó AG)	Amarillo (A Ó AG)

Tabla 1. Reporte de resultados de O / F

6. REACCIÓN DE LA UREASA

❖ Medio de cultivo: Agar urea de Christensen

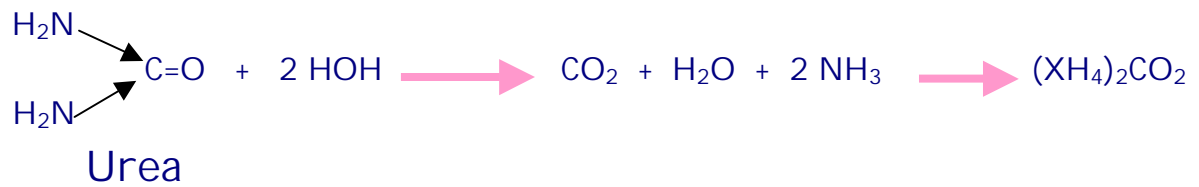
Composición:

- a) Peptona
- b) Cloruro de sodio
- c) Fosfato monopotásico
- c) Glucosa
- d) Urea
- e) Agar
- f) Agua destilada
- g) Indicador de pH: Rojo de fenol
 - Ácido: Amarillo (pH = 6.8)
 - Alcalino : Rojo rosado (pH = 8.4)
 - Medio no inoculado: Amarillo (pH = 6.8)

❖ Fundamento

Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima **ureasa** produciendo un cambio de color rojo en el medio.

La hidrólisis de la urea es catalizada por la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. La ureasa es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos.



❖ Consistencia del medio

Sólido en pico de flauta (cola de pescado)

❖ Inoculación

Estría en pico de flauta (no hacer punción).

❖ Condiciones de incubación

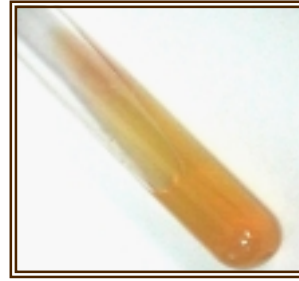
Tiempo: 18-24 horas

Temperatura: 35-37° C

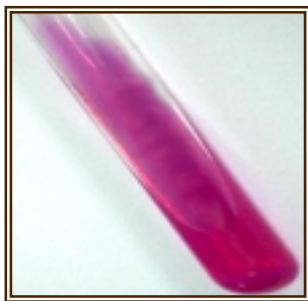
❖ Resultados



MEDIO NO INOCULADO



NEGATIVO



POSITIVO



POSITIVO

Figura 22. Pruebas bioquímicas: Urea

❖ Interpretación

Positivo: Rojo rosado intenso en el pico de flauta

Negativo: Amarillo

❖ Reporte de resultados

Positivo (+)

Negativo (-)

❖ Observaciones

En muchas especies, la reacción positiva de ureasa se detecta primero por un cambio de color rojo en la parte de pico de flauta, el cual, al principio se vuelve rojo porque la acción alcalina, resultado de la degradación de pequeñas cantidades de urea, es aumentada por las aminas formadas a partir de la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos en la parte del medio expuesta al aire.

❖ Aplicaciones

1. Se usa para diferenciar los organismos *Proteus* rápidamente ureasa positivos de otros miembros de las enterobacterias, otros géneros pueden ser positivos retardados.



Figura 23. *Salmonella typhi*

- *Klebsiella* (+)
- *Escherichia coli* (-)
- *Proteus* (+ rápido)
- *Providencia* (-)

8. REACCIÓN DE VOGES-PROSKAUER (VP)

- ❖ Medio de cultivo: Medio de Clark y Lubs (caldo RM/VP)

Composición:

- Polipeptona
- Dextrosa
- Fosfato de potasio
- Agua destilada

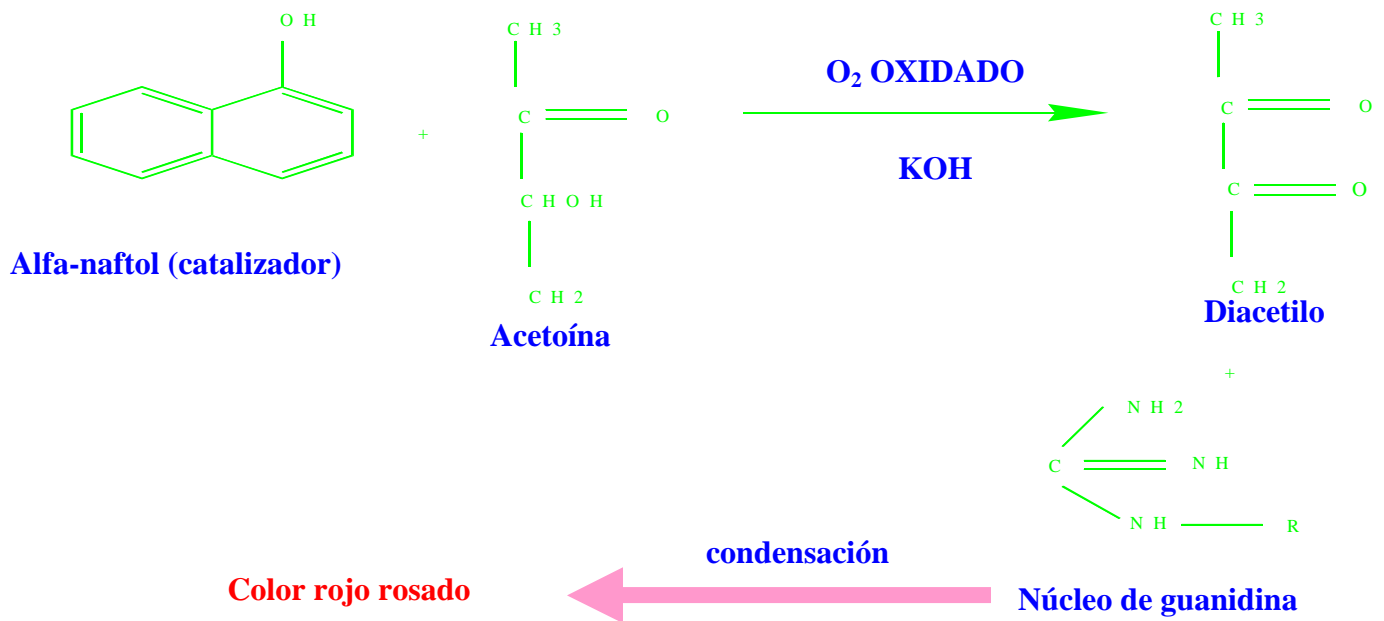
❖ Fundamento

Determina la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, la acetoína a partir de la fermentación de glucosa.

La reacción de VP se basa en la detección de acetoína como producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. Ésta es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave en la glucólisis. A partir del ácido pirúvico, una bacteria puede seguir muchas vías. La producción de acetoína (precursor de la producción de 2,3-butanediol) que es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias. La formación de acetoína y butilenglicol es una vía alternativa del metabolismo del ácido pirúvico. Las bacterias que utilizan esta vía producen solo pequeñas cantidades de ácidos mixtos que son insuficientes

para disminuir el pH del medio de rojo de metilo, lo bastante como para producir un cambio de color. Por este motivo muchas de las especies de Enterobacterias son VP positivas, con pocas excepciones son RM negativas y viceversa.

El primer reactivo agregado a una alícuota incubada es el catalizador alfa-naftol porque éste actúa como intensificador del color, lo que aumenta la sensibilidad de la reacción sin pérdida de su especificidad. El segundo reactivo es el KOH que cuando se agrega al medio de VP contribuye a la absorción de CO₂. No debe excederse de un volumen exacto. El KOH reaccionará con la peptona dando un color rosado salmón y con el agregado posterior de alfa-naftol no habrá alteración del color.



❖ Consistencia del medio

Líquido

❖ Inoculación

Difusión

❖ Condiciones de incubación

Tiempo: 24 - 48 horas

Temperatura: 35-37° C

❖ Reactivos adicionales

- a) Alfa naftol al 5%, intensificador del color
- b) Hidróxido de potasio 40%, agente oxidante

Agregar directamente los reactivos al tubo después de la incubación en el siguiente orden:

- 1) 0.6ml de alfa naftol
- 2) 0.2ml de KOH
- 3) Agitar el tubo suavemente, dejar reposar de 10 a 15 minutos antes de la interpretación.

❖ Precauciones

El orden de adición de los reactivos es importante, ya que la inversión de incorporación dará como resultado un débil positivo o falso negativo.

No debe excederse un volumen exacto de KOH ya que el exceso puede ocultar una reacción VP débilmente positiva.

❖ Resultados



Figura 24. Prueba bioquímicas de la reacción de Voges - Proskauer

❖ Interpretación

Positivo: Rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoína).

Negativo: Amarillo. Puede formarse un color cobrizo pero aún así la reacción es negativa.

❖ Reporte de resultados

Positivo (+)

Negativo (-)

❖ Aplicaciones

❖ Microorganismos positivos

- Klebsiella pneumoniae
- Yersinia enterocolitica

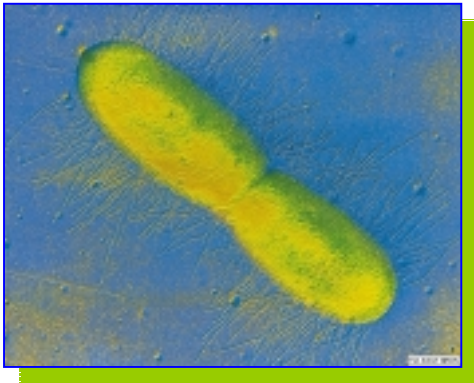


Figura 25. *Escherichia coli*

❖ Microorganismos negativos

- Escherichia coli
- *K. ozaenae*

9. REACCIÓN DE ROJO DE METILO (RM)

❖ Medio de cultivo : Medio de Clark y Lubs (caldo RM/VP)

Composición:

e) Polipeptona

f) Dextrosa

g) Fosfato de potasio

h) Agua destilada

i) Indicador: rojo de metilo

PH inicial = 6.9, medio no inoculado, color rojo.

Ácido: rojo (pH = 4.4)

Alcalino: amarillo (pH = 6)

❖ Fundamento

Comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. Es una prueba cualitativa de la producción de ácido (determinación de pH). Las bacterias que principalmente siguen la vía de fermentación de ácidos mixtos a menudo producen suficiente ácido para mantener un pH menor de 4.4.

La prueba de rojo de metilo se basa en el empleo de un indicador de pH para determinar la concentración de iones hidrógeno presentes cuando un organismo fermenta glucosa. Las bacterias RM positivas producen ácidos estables manteniendo una alta concentración de iones hidrógeno hasta alcanzar cierta concentración y entonces cesa toda actividad.

Los organismos RM negativo también producen ácidos pero tienen una menor concentración de iones hidrógeno porque hay una reversión hacia la neutralidad debida a la nueva degradación de los ácidos orgánicos en carbonatos.

La validez de la prueba de RM depende de un tiempo de incubación suficiente como para permitir que se produzca la diferencia en el metabolismo de la glucosa. Los organismos en estudio se incubarán por lo menos 2 días, lo que permite que todos los organismos con baja proporción gaseosa muestren su límite en la concentración de iones hidrógeno.

❖ Consistencia del medio

Líquido

❖ Inoculación

Difusión

❖ Condiciones de incubación

Tiempo: 48 horas

Temperatura: 35-37° C

❖ Reactivos adicionales para Rojo de Metilo

Rojo de metilo. Adicionar 5 gotas al tubo previamente incubado.

Interpretar el resultado del color inmediatamente.

Conservación: Guardar el reactivo en refrigeración (4° C) mientras no se usa.

❖ Resultados



Figura 26. Pruebas bioquímicas de la reacción de Rojo de Metilo

❖ Interpretación de rojo de metilo

No debe intentarse interpretar un resultado con el rojo de metilo después de menos de 48 horas de incubación.

Positiva: Rojo en la superficie del medio (pH = 4.4)

Algunas bacterias pueden producir menores cantidades de ácido a partir del sustrato por ello es posible que aparezca un color naranja. Esto indica una prueba positiva.

Negativo: Amarillo (pH = 6) ó naranja

❖ Reporte de resultados

Positivo (+)

Negativo (-)



Figura 27. E. coli showing pili

❖ Aplicaciones

▪ Microorganismos positivos

- *Escherichia coli*
- Especies de *Yersinia*

▪ Microorganismos negativos

- *Enterobacter aerogenes*
- *Enterobacter cloacae*
- *Klebsiella*

10. PRUEBA DE REDUCCIÓN DE NITRATOS

❖ Medio de cultivo: Caldo con nitrato

Ingredientes:

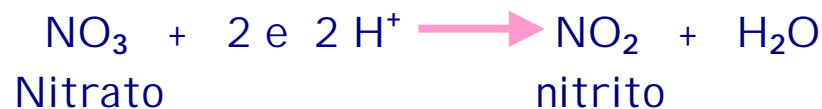
- a) Extracto de carne
- b) Peptona
- c) Nitrato de potasio
- d) Agar
- e) Agua destilada
- f) PH inicial = 7.0

❖ Fundamento

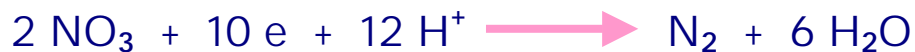
Determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre.

La reducción de nitrato en nitrito y en gas nitrógeno tiene lugar generalmente en condiciones anaerobias, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato. El oxígeno sirve como un aceptor de hidrógeno.

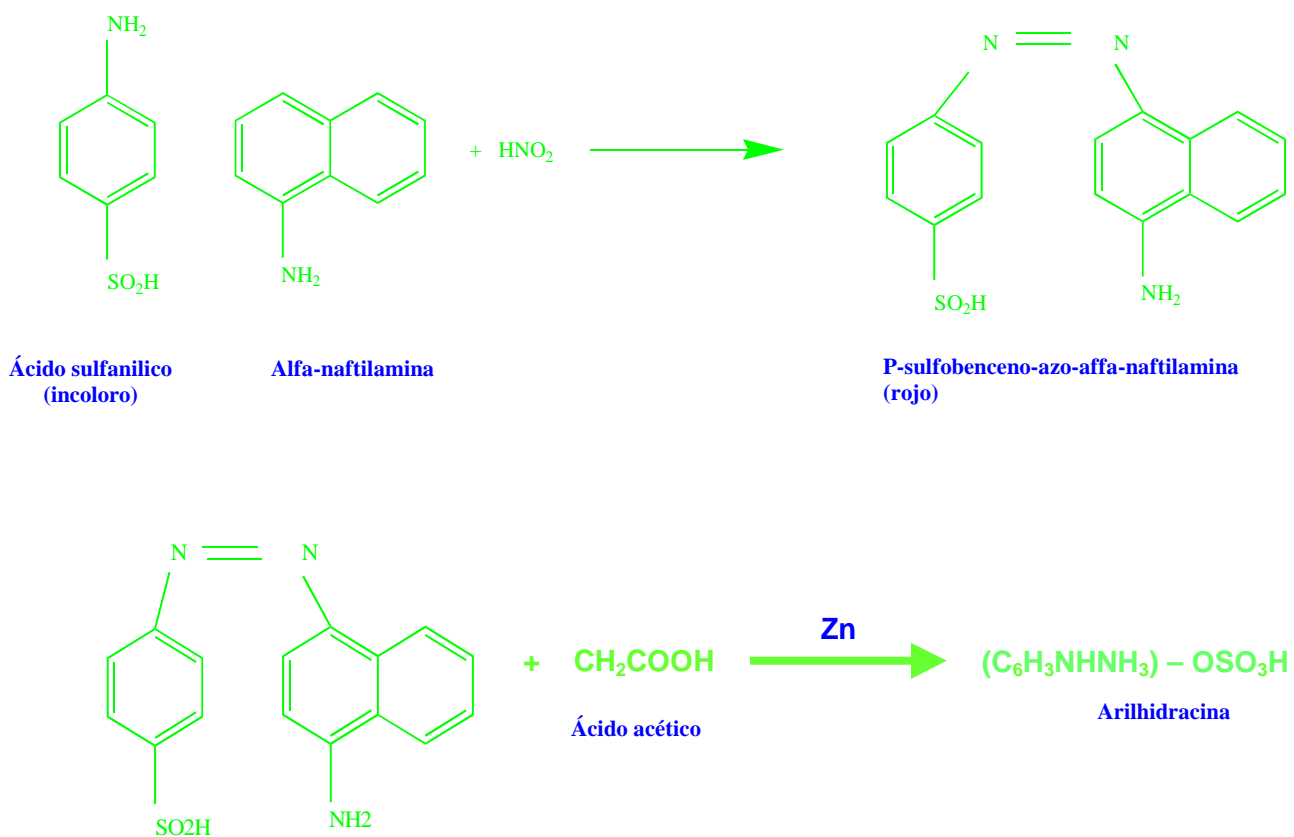
Reducción del nitrato en nitrito



Nitrato en nitrógeno molecular



La reducción de nitrato en nitrito está indicada por la aparición de color cuando el nitrito reacciona con los dos reactivos. La reacción de color resultante se debe a la formación de un compuesto diazoico, p-sulfobenceno-azo-alfa-naftilamina.



❖ Consistencia del medio

Líquido

❖ Inoculación

Difusión, inóculo denso.

❖ Condiciones de incubación

Tiempo: 18-24 horas

Temperatura 35 - 37 ° C

Raramente es necesaria una incubación prolongada de hasta 5 días. La mayoría de los organismos capaces de reducir el nitrato, lo hacen dentro de las 24 horas.

❖ Reactivos adicionales

1. Alfa - naftilamina 0.05 %
2. Ácido sulfanílico 0.8 %

Adicionar directamente al tubo de reacción en el siguiente orden:

1. Alfa - naftilamina 1 ml.
2. Ácido sulfanílico 1 ml.

Conservación: Guardar ambos reactivos en el refrigerador mientras no se usan. Por lo general se mantienen estables durante tres meses.

❖ Resultados



Figura 28. Pruebas bioquímicas de Reducción de Nitritos

❖ Interpretación

Se interpretan los resultados un minuto después de adicionar los reactivos.

Positivo: rosa a rojo intenso

Negativo: Amarillo

❖ Precauciones

Una prueba negativa indica que los nitratos, no han sido reducidos o que han sido reducidos a otros productos, como amoniaco, nitrógeno molecular, oxido nítrico u óxido nitroso e hidroxilamina.

Dado que los reactivos de prueba detectan solo nitritos, este último proceso llevaría a una lectura falsa – negativa. Por ende es necesario agregar una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones negativas.

Los iones zinc reducen nitratos a nitritos y la aparición de color rojo después del agregado de zinc indica una reacción positiva.

❖ Reporte de resultados

Positivo (+)

Negativo (-)

❖ Aplicaciones

Ayuda a la identificación de Enterobacterias que por lo general son positivas.

Todas las Enterobacterias, con excepción de ciertos tipos de *Enterobacter agglomerans* y especies de *Erwinia*, reducen nitratos a nitritos.

11. PRUEBA DE FENILALANINA DESAMINASA

❖ Medio de cultivo: agar fenilalanina

Composición:

- a) D-L-fenilalanina
- b) Extracto de levadura
- c) Cloruro de sodio
- d) Fosfato de sodio
- e) Agar
- f) Agua destilada
- g) PH inicial = 7.3

❖ Fundamento

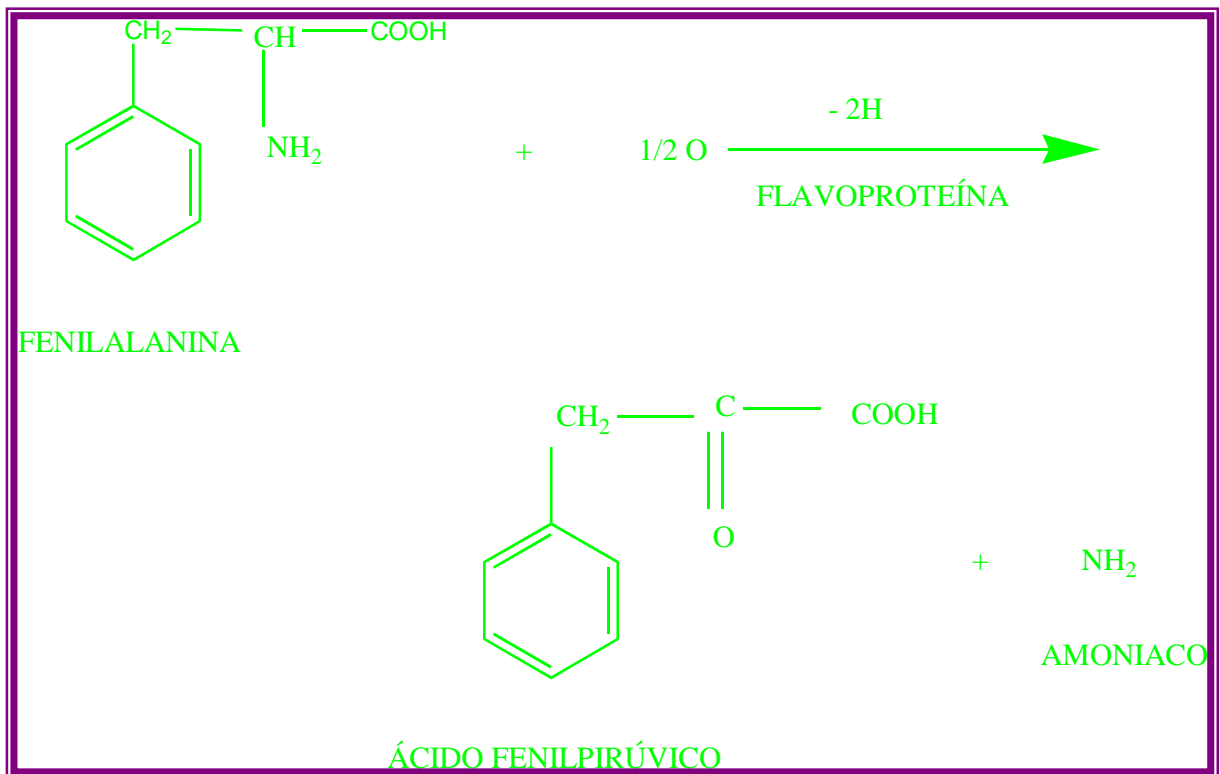
Determina la capacidad de un organismo de desaminar la fenilalanina en ácido fenilpirúvico por su actividad enzimática, con la consiguiente acidez resultante.

El aminoácido aromático fenilalanina sufre una desaminación oxidativa catalizada por un aminoácido oxidasa para producir el ácido cetónico.

La desaminación oxidativa da como resultado la extracción del grupo amino del aminoácido para formar un doble enlace alfa-cetoácido y libre de amoníaco.

Este es un proceso en dos etapas:

1. La extracción del hidrógeno dando un aminoácido y el hidrógeno se combina con el oxígeno para formar agua.
2. El aminoácido es hidrolizado en un cetoácido

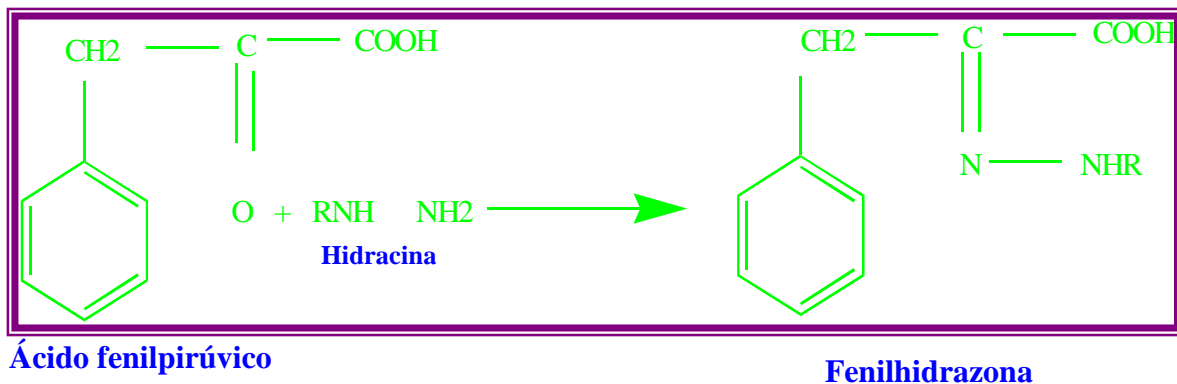


Química de la acción reactiva

Como la fenilalanina se encuentra desaminada, el color producido como consecuencia del agregado de cloruro férrico al 10 % se debe a la formación de un cetoácido el

ácido fenilpirúvico. La reacción positiva con este reactivo se debe a la formación de una hidrazona. El cloruro férrico actúa como agente quelante actuando con el ácido fenilpirúvico para formar un color verde.

Cuando se expone al oxígeno atmosférico un tubo de cultivo con fenilalanina después del agregar el cloruro férrico aumenta la producción y la intensidad de la reacción positiva.



❖ Consistencia del medio

Sólido en pico de flauta

❖ Inoculación

Estría en pico de flauta, inóculo denso.

❖ Condiciones de incubación

Tiempo: 18-24 horas

Temperatura 35 - 37° C

❖ Reactivos adicionales

Cloruro férrico 10%

Adicionar de 4-5 gotas a un tubo incubado

Hacer rotar suavemente el tubo para que el crecimiento se separe.

Esperar de 1 a 5 minutos para leer la reacción.

Conservación: Guardar los reactivos en refrigeración y colocarlos en frascos oscuros para evitar la descomposición.

❖ Aplicaciones

Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y del grupo *Providencia*, y se usa para separar estos dos géneros de otros miembros de las Enterobacterias.

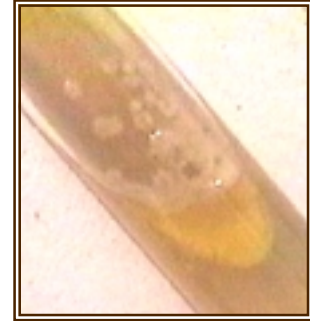
❖ Resultados



**MEDIO NO
INOCULADO**



POSITIVO



NEGATIVO



NEGATIVO



Figura 29. Pruebas bioquímicas de fenilalanina desaminasa

❖ Interpretación

Positiva: Rojo claro a intenso en el pico de flauta.

Negativo: Amarillo

❖ Reporte de resultados

Positivo (+)

Negativo (-)

12. PRUEBA DE SULFURO INDOL MOVILIDAD (SIM)

❖ Medio e cultivo: Medio SIM

Composición:

- a) Extracto de carne
- b) Peptona
- c) Hierro peptonizado (indicador de SH₂)
- d) Tiosulfato de sodio (indicador de SH₂)
- e) Agar
- f) Agua destilada
- g) pH = 7.3

❖ Fundamento

Determinar si un organismo es móvil o inmóvil, si es capaz de liberar ácido sulfhídrico por acción enzimática de los aminoácidos que contienen azufre produciendo una reacción visible de color negro y por último la capacidad de desdoblar el indol de la molécula triptófano, además que la consistencia del medio permite la observación de la movilidad de algunas bacterias.

1. Producción de ácido sulfhídrico
2. Producción de indol
3. Movilidad

1. Prueba de ácido sulfhídrico

La proteólisis de las proteínas en aminoácidos (aa.) individuales, algunas especies bacterianas son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los diferentes aa. que las contienen, produciendo el gas ácido sulfhídrico (SH_2). La peptona, cisteína y tiosulfato, todos son fuentes de azufre, pero las diferentes especies utilizan distintos compuestos o aa. que contienen azufre para producir SH_2 . La enzima responsable de ésta actividad es la cisteinasa.

Primera etapa:

La bacteria reacciona con el tiosulfato de sodio por medio de una reacción de reducción que da un sulfito y un sulfato. Este es un proceso de respiración anaeróbica donde el átomo de azufre sirve como aceptor de electrones para la oxidación de los sustratos orgánicos. El tiosulfato reemplaza al sulfato como aceptor de electrones y es una fuente de azufre para el organismo.

Segunda etapa:

El gas incoloro SH_2 reacciona con una sal pesada, citrato férrico de amonio para producir un precipitado negro insoluble, sulfuro ferroso.

Bacteria (medio ácido) + tiosulfato de sodio \longrightarrow gas SH_2

SH_2 + iones férricos \longrightarrow sulfuro ferroso (pp. negro)

Medios para la detección de H_2S

- ❖ Agar sulfito de bismuto
- ❖ Agar citrato sulfuro
- ❖ Agar desoxicolato - citrato
- ❖ Medio LI A
- ❖ Medio TSI
- ❖ Agar acetato de plomo
- ❖ Agar S-S
- ❖ Agar XLD
- ❖ Medio SIM

2. Prueba de la producción de indol

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos principales: indol, escatol e indolacético. Diversas enzimas intracelulares que intervienen en éste proceso reciben el

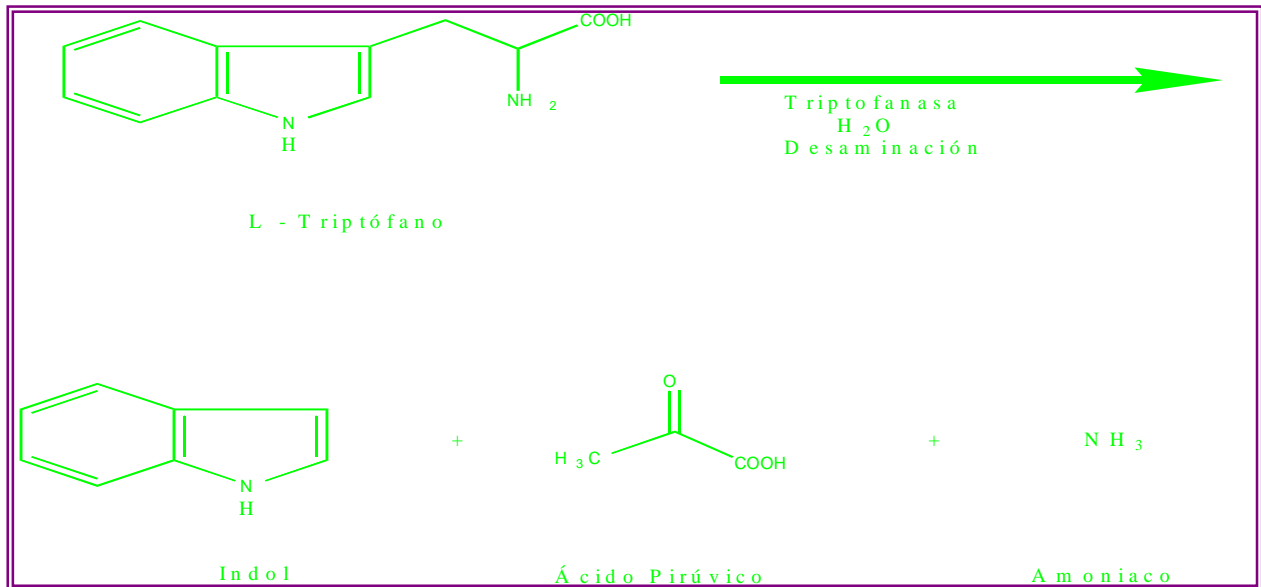
nombre de triptofanasa, lo que implica el sistema completo de enzimas vinculadas con la producción del indol. El principal intermediario en la degradación del triptófano es el ácido indolpirúvico.

La degradación del triptófano libera indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía. El ácido pirúvico puede ser nuevamente metabolizado por medio del ciclo glucolítico o entrar en el ciclo de Krebs para liberar CO_2 y H_2O y una gran producción de energía. El NH_3 puede ser utilizado para sintetizar nuevos aminoácidos empleando la energía que se encuentra para la reacción anabólica.

La prueba de indol se basó en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído de p-dimetilaminobenzaldehído (sustancia activa del reactivo de Kovacs).

La formación de indol se produce solamente en aquellos organismos capaces de fermentar los hidratos de carbono. La elevada acidez producida por la fermentación de la glucosa puede impedir el crecimiento del organismo o inhibir la enzima.

El agregado de triptófano estimula la producción de indol mientras que la glucosa la inhibe.



3. Movilidad

Determina si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos; sin embargo algunas formas de cocos son inmóviles.

Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos; además su localización varía con su especie bacteriana y las condiciones de cultivo. A veces, las bacterias con movilidad producen variantes no móviles que parecen ser estables y raramente se revierten en formas móviles.

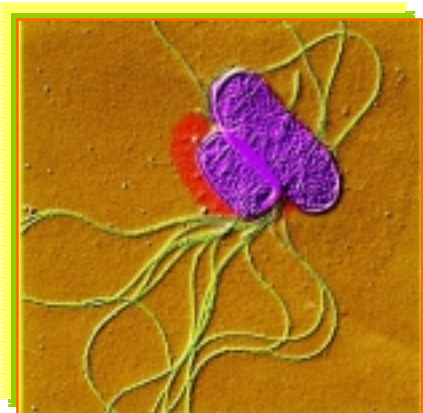


Figura 30. *Salmonella typhi*

Medios para la detección de movilidad

1. SIM
2. MIO

❖ Consistencia del medio

Semisólido en forma vertical

❖ Inoculación

Picadura en forma vertical

❖ Condiciones de incubación

Tiempo: 24 - 48 horas

Temperatura 35 - 37° C

Los cultivos que van a someterse a pruebas de indol deberán ser incubados aeróbicamente el descenso de la tensión de oxígeno disminuye la producción de indol.

❖ Reactivos adicionales

Prueba de indol

Reactivo de Kovacs

Adicionar 5 gotas y agitar suavemente el tubo

Interpretar inmediatamente.

Conservación: Los reactivos deberán guardarse en el refrigerador (4° C) mientras no se usan, su estabilidad es variable, por lo tanto se hará todas las semanas un control de calidad, desechándolos si muestran una reacción débil o negativa con un organismo positivo conocido.

❖ Reporte de resultados

PRUEBA	POSITIVO	NEGATIVO
Sulfuro	+	-
Indol	+	-
Movilidad	+	-

Tabla 2. Reporte de resultados del medio SIM

❖ Resultados



MEDIO SIN
INOCULAR



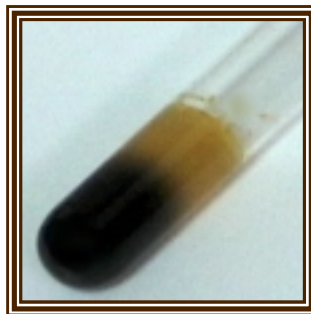
INDOL
POSITIVO



INDOL
NEGATIVO



GAS



H₂S
POSITIVO



H₂S
NEGATIVO

Figura 31. Pruebas bioquímicas del medio SIM

❖ Interpretación

1. Ácido sulfhídrico

Positivo: Ennegrecimiento del medio

Negativo: Sin ennegrecimiento

2. Indol

Positivo: Anillo rojo en la superficie del medio.

Negativa: No se produce color

Negativa: Color naranja en la superficie del medio. Indica desarrollo de escatol, un compuesto metilado que puede ser el precursor de la formación de indol.

La reacción positiva después de 24 horas indica una prueba completa.

Si el cultivo de 24 horas es negativo deberá incubarse otras 24 horas y repetirse la prueba.

3. Movilidad

Positiva. Los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbiedad.

Negativa. Crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra.

❖ Aplicaciones

Bacterias	Producción de H ₂ S	Producción de indol	Movilidad
<u><i>Salmonella typhi</i></u>	+ 0 -	-	+
<i>Salmonella</i>	+ 0 -	-	+
<i>E. coli</i>	-	+	+ 0 -
<i>Klebsiella</i>	-	+ 0 -	-
<i>Enterobacter</i>	-	-	+
<i>Citrobacter</i>	+	-	+
<i>Shigella</i>	-	+ 0 -	+ 0 -

Tabla 3. Aplicaciones del medio SIM



Figura 32. *Salmonella typhi*

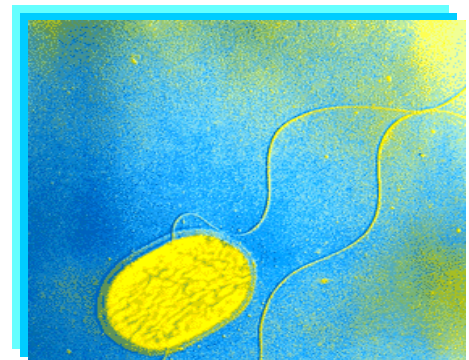


Figura 33. *Escherichia coli*

12. AGAR TRIPLE AZUCAR HIERRO: TSI

- ❖ Medio de cultivo: Agar hierro triple azúcar (agar hierro de Kligler, AHK)

Composición:

- f) Extracto de carne
- g) Extracto de levadura
- h) Peptona
- i) Proteasa
- j) Lactosa
- k) Dextrosa
- l) Sulfato ferroso
- m) Cloruro de sodio
- n) Tiosulfato de sodio
- o) Agar
- p) Agua destilada
- q) Indicador: Rojo de fenol
 - Ácido: amarillo
 - Alcalino: rojo
 - Medio no inoculado: naranja rojizo (pH =7.4)

❖ Fundamento

Determina la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible ácido sulfhídrico.

El agar AHK es un medio diferencial que determina tanto la fermentación de los hidratos de carbono y la producción de ácido sulfhídrico. Las bacterias pueden utilizar cualquiera de los sustratos incorporados en el medio y ser metabolizados, características que son utilizadas para la diferenciación de éstas, principalmente para las Enterobacterias.

Este medio contiene lactosa con una concentración de 1% y glucosa 0.1%, lo cual permite la observación de la fermentación de uno o de ambos carbohidratos por parte de las bacterias, además de la producción de gas y de ácido sulfhídrico.

La fermentación es un proceso que se lleva acabo en condiciones aeróbicas (pico de flauta) y anaeróbicamente (capa inferior). En el pico de flauta la glucosa (monosacárido) es catabolizada inicialmente por medio del ciclo anaeróbico de Embden-Meyerhof, utilizado tanto por los aerobios como por los anaerobios para dar ácido pirúvico, y posteriormente éste será degradado a través del ciclo de Krebs para dar CO₂, H₂O y energía.

Por otra parte la lactosa (disacárido) será primero degradada a sus monosacáridos correspondientes (glucosa y galactosa).



El medio TSI contiene una cantidad limitante de glucosa y una concentración 10 veces mayor de lactosa. Las Enterobacterias y los fermentadores de glucosa comienzan metabolizando este azúcar, ya que las enzimas que utilizan la glucosa están presentes como constituyentes de las bacterias, y éstas pueden obtener mayor energía por utilización del azúcar más simple.

Todos los otros carbohidratos deben ser convertidos en glucosa para entrar en el ciclo de Embden-Meyerhof. La utilización de la glucosa se realiza en forma aerobia sobre la estría, donde el oxígeno presente actúa como aceptor terminal de electrones y en la parte terminal de la columna en condiciones de anaerobiosis. Una vez que una bacteria fermentadora de glucosa ha reducido toda la glucosa disponible a piruvato, comenzará a metabolizar el piruvato a través del ciclo aeróbico de Krebs (sobre la estría), formando

productos finales ácidos. El ácido en el medio hace virar el amarillo del indicador de pH, rojo de fenol. Entonces, luego de 6 horas de incubación, la zona de la estría y el fondo del tubo inoculado con un fermentador de glucosa tendrán un color amarillo. Si el microorganismo no fermenta la glucosa, el fondo permanecerá rojo (indicando que no hay variación del pH) o se alcalinizará (lo que puede visualizarse por un color rojo algo más intenso que del medio original), demostrando que la bacteria no es miembro de la familia Enterobacteriaceae.

Después de haber agotado la cantidad limitada de glucosa, una bacteria con capacidad para utilizar la lactosa o sacarosa comenzará a degradarlas. Como el medio contiene 10 veces más lactosa que glucosa, las bacterias encontrarán sustrato suficiente para continuar la formación de productos finales ácidos. Luego 18 - 24 horas de incubación todo el medio TSI permanecerá de color amarillo. Esta reacción se denomina ácido sobre ácido (A/A) y el organismo se identifica como un fermentador de lactosa. La producción de gas provocará la ruptura de la columna de agar o la empujará hacia la parte superior, de modo que un fermentador de lactosa que produce gas dará una reacción A/A más gas.

Si el organismo en estudio no es capaz de usar la lactosa del medio, debe producir energía en forma menos eficiente al utilizar las proteínas y aminoácidos del medio como fuentes nutritivas.

El metabolismo proteico se produce en la superficie de la zona inclinada donde el oxígeno es abundante. Los productos de la degradación de la peptona (como el amoníaco) son alcalinos y provocan el viraje del indicador rojo de fenol a su color rojo original. Un TSI inoculado con una bacteria que no fermenta la lactosa al cabo de 18-24 horas de incubación presentará la zona inclinada roja y el fondo del agar permanecerá amarillo debido al metabolismo anaerobio de la glucosa durante la primera etapa. Esta reacción se denomina alcalina sobre ácido (K/A).

Las bacterias que fermentan la glucosa también pueden formar productos alcalinos a partir de la utilización de la peptona, sobre la zona inclinada. Estas reacciones serán K/K.

❖ Consistencia del medio

Sólido en pico de flauta

❖ Inoculación

Picadura y estría en pico de flauta

❖ Condiciones de incubación

Tiempo: 18 - 24 horas

Temperatura: 35 - 37 ° C

❖ Resultados



Figura 34. Pruebas bioquímicas del medio TSI



Figura 35. *Salmonella*

❖ Interpretación

1. Rojo en pico de flauta: alcalino; degradación aeróbica de glucosa.
Amarillo en capa profunda: ácido; degradación anaeróbica de la glucosa.
2. Amarillo en pico: ácido
Amarillo en capa profunda: ácido
3. Rojo en pico de flauta: alcalino
Sin cambio de color en capa profunda: alcalina.
4. Producción de H_2S : precipitado negro
5. Producción de gases: Producción de burbujas, descomposición del medio, ligera muesca del medio sobre el costado del tubo o desplazamiento del medio del fondo, dejando un espacio libre.

❖ Observaciones

Una bacteria productora de H_2S puede dar tal cantidad de precipitado negro de sulfuro ferroso que oculte completamente la acidez producida en la capa profunda. Sin embargo, si se forma H_2S es que existe en la capa profunda una condición ácida, aun cuando no se observe, y debe ser registrada como tal.

Es esencial que se interprete la fermentación al término de 18 - 24 horas de incubación, ya que una interpretación prematura o demorada dará formas de fermentación no válidas que llevarán a errores en el agrupamiento del género o especie.

❖ Reporte de resultados

1. K / A (Fermentación de glucosa solamente)
2. A / A (Fermentación de glucosa y lactosa)
3. K / K (No fermentación de glucosa y lactosa).

Los resultados se escriben siempre siguiendo un patrón. Primero la reacción del pico de flauta seguida por la reacción de la capa profunda, separadas por una barra.

❖ Reacciones de TSI

Pico de flauta alcalino / profundidad alcalina (K/K). No fermentación de hidratos de carbono. Característico de bacterias no fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa*.

Pico de flauta alcalino / profundidad ácida (K/A). Glucosa fermentada, lactosa no fermentada. Característico de bacterias no fermentadoras de lactosa como especies de *Shigella*.

Pico de flauta alcalino / profundidad ácida (negra) (K/A/H₂S). Glucosa fermentada, lactosa no fermentada; producción de H₂S. Característico de bacterias no fermentadoras de lactosa y productoras de H₂S como: *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter* y algunas especies de *Proteus*.

Pico de flauta ácido / profundidad ácida (A/A). Glucosa y lactosa fermentadas. Característico de coliformes que fermentan lactosa como: *E. coli* y grupo *Klebsiella-Enterobacter*.

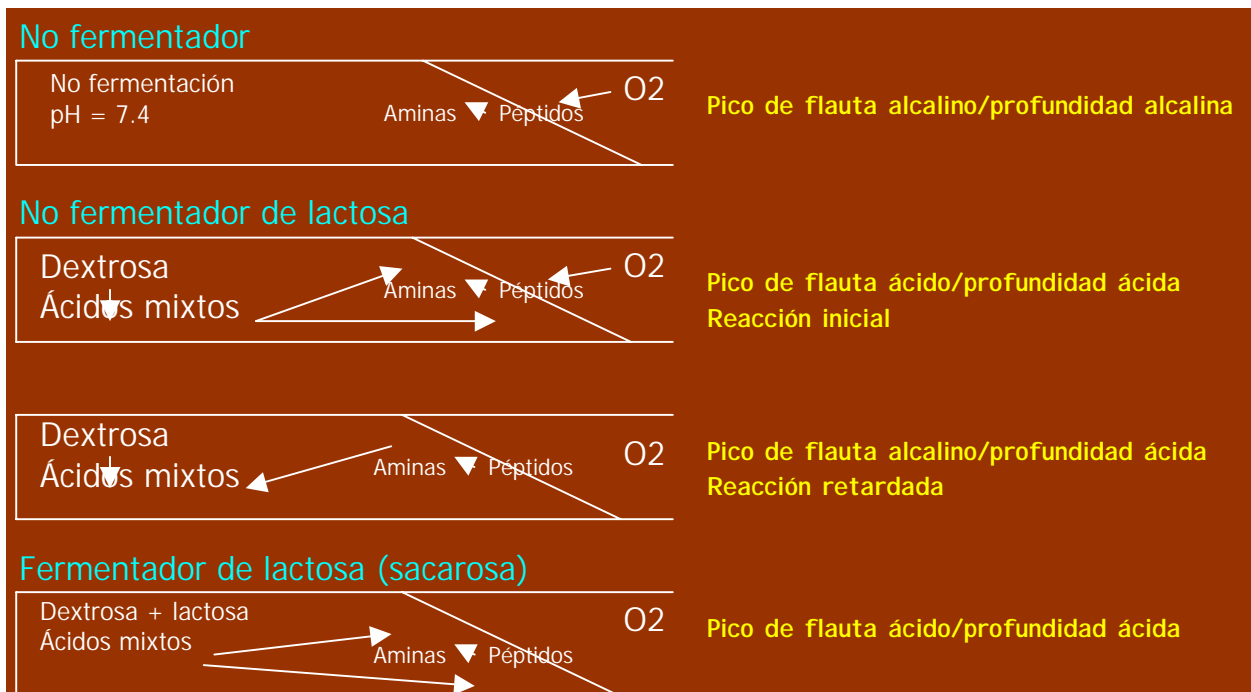


Figura 36. Fundamento de la Prueba bioquímica TSI

❖ Aplicaciones

Este tipo de pruebas se utilizan principalmente para la identificación primaria de los miembros de las Enterobacterias.

Especie bacteriana	Superficie inclinada	Fondo	Gas	H ₂ S
<i>Enterobacter</i>	A	K	++	-
<i>Hafnia</i>	K	A	+	-
<i>Klebsiella</i>	A	A	++	-
<i>E. coli</i>	A	A	+	-
<i>Shigella</i>	K	A	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	K	A	-	+
<i>S. paratyphi</i>	K	A	+	-
<i>S. choleraesuis</i>	K	A	+	-
Otras <i>Salmonellas</i>	K	A	+	+++
<i>Citrobacter</i>	K	A	+	+++
<i>Edwardsiella</i>	K	A	+	+++
<i>Serratia</i>	K	A	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	K	A	+	+++
<i>P. mirabilis</i>	K	A	+	+++
<i>P. morgani</i>	K	A	-	-
<i>P. rettgeri</i>	K	A	-	-
<i>Providencia</i>	K	A	+ 0 -	-

Tabla 4. Aplicaciones de la Prueba con TSI

13. Agar lisina hierro: LIA

❖ Medio de cultivo: Base de descarboxilasa de Moller

Composición:

- a) Peptona
- b) Extracto de carne
- c) Piridoxal
- d) L-lisina
- e) Citrato de amonio
- f) Tiosulfato de sodio
- g) Glucosa
- h) Agua destilada
- i) Agar
- j) Indicador de pH: Púrpura de bromocresol
 - Ácido: color amarillo (pH = 5.2)
 - Alcalino: color púrpura (pH = 6.8)
 - Medio no inoculado: color púrpura intenso brillante (pH = 6.0)

❖ Fundamento

Mide la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido (lisina y arginina) para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad.

La descarboxilación es el proceso mediante el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico. La descomposición de los aminoácidos se produce anaeróbicamente. El proceso de descarboxilación es irreversible, no oxidativo y requiere una coenzima común, el fosfato de piridoxal.

El aminoácido L-lisina sufre la descarboxilación para dar cadaverina y CO₂ por acción de la enzima específica lisina-decarboxilasa.

❖ Consistencia del medio

Sólido en pico de flauta

❖ Reporte de resultados

❖ Inoculación

Por picadura y estría, inóculo liviano.

A = Ácido

K = Alcalino

N = Neutra

R = Rojo (desaminación oxidativa)

❖ Condiciones de incubación

Temperatura: 35 -37° C

Tiempo: 18 - 24 horas

❖ Resultados



Figura 37. Pruebas bioquímicas con medio LIA

❖ Interpretación

K/K = azul de Prusia / azul de Prusia

Desaminación oxidativa / descarboxilación

K/A= azul de prusia / lila

No desaminación

Producción de H₂S = Ennegrecimiento del medio

Producción de gas = Burbujas o levantamiento del medio de cultivo de las paredes del tubo.

❖ Aplicaciones

Espece bacteriana	Superficie inclinada	Fondo	Gas	H ₂ S
<i>E. coli</i>	K	K o N	- 0 +	-
<i>Shigella</i>	K	A	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	K	K	-	+ 0 -
<i>S. paratyphi</i>	K	A	+ 0 -	- 0 +
Otras <u><i>Salmonellas</i></u>	K	K o N	-	+
<i>Arizona</i>	K	K o N	-	+
<i>Citrobacter</i>	K	A	- 0 +	+ 0 -
<i>Edwardsiella</i>	K	K	- 0 +	+
<i>Klebsiella</i>	K	K o N	+ 0 -	-
<u><i>Enterobacter cloacae</i></u>	K	A	+ 0 -	-
<i>E. aerogenes</i>	K	K o N	+	-
<i>E. hafniae</i>	K	K o N	- 0 +	-
<i>Proteus vulgaris</i>	R	A	-	-
<i>P. mirabilis</i>	R	A	-	-
<i>P. morgarnii</i>	K o R	A	-	-
<i>P. rettgeri</i>	R	A	-	-
<i>Providencia</i>	R	A	-	-

Tabla 5. Aplicaciones de la Prueba Bioquímica LIA

13. Movilidad, indol y ornitina: MIO

❖ Medio de cultivo

Composición:

- a) Extracto de levadura
- b) Peptona
- c) L-ornitina
- d) Dextrosa
- e) Agar
- f) Agua
- g) Indicador de pH: púrpura de bromocresol
 - Ácido: color amarillo (pH = 5.2)
 - Alcalino: color púrpura (pH = 6.8)
 - Medio no inoculado: color púrpura intenso brillante (pH = 6.0)

❖ Fundamento

El medio MIO se utiliza para la identificación de Enterobacterias sobre la base de movilidad, la producción de ornitina descarboxilasa y de indol.

1. Descarboxilación de ornitina
2. Producción de indol
3. Movilidad

1. Descarboxilación de ornitina

Mide la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar un aminoácido (ornitina) para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad.

La descarboxilación es el proceso mediante el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico. La descomposición de los aminoácidos se produce anaeróbicamente. El proceso de descarboxilación es irreversible, no oxidativo y requiere una coenzima común, el fosfato de piridoxal.

El aminoácido L-lisina sufre la descarboxilación para dar cadaverina y CO_2 por acción de la enzima específica lisina-descarboxilasa.

El aminoácido L-ornitina es descarboxilado por la enzima ornitina descarboxilasa para dar la diamina putrescina y CO_2 , producidos en condiciones anaerobias.

2. Prueba de la producción de indol

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

Diversas enzimas intracelulares que intervienen en éste proceso reciben el nombre de triptofanasas, lo que implica el sistema completo de enzimas vinculadas con la producción del indol. El principal intermediario en la degradación del triptófano es el ácido indolpirúvico.

La degradación del triptófano libera indol, ácido pirúvico, amoníaco y energía. El ácido pirúvico puede ser nuevamente metabolizado por medio del ciclo glucolítico o entrar en el ciclo de Krebs para liberar CO₂ y H₂O y una gran producción de energía. El NH₃ puede ser utilizado para sintetizar nuevos aminoácidos empleando la energía que se encuentra para la reacción anabólica.

La prueba de indol se basa en la formación de un complejo de color rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído de p-dimetilaminobenzaldehído (sustancia activa del reactivo de Kovacs).

La formación de indol se produce solamente en aquellos organismos capaces de fermentar los hidratos de carbono. La elevada acidez producida por la fermentación de la glucosa puede impedir el crecimiento del organismo o inhibir la enzima. El agregado de triptófano estimula la producción de indol mientras que la glucosa la inhibe.

3. Movilidad

Determina si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos; sin embargo algunas formas de cocos son inmóviles.

Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos; además su localización varía con su especie bacteriana y las condiciones de cultivo. A veces, las bacterias con movilidad producen variantes no móviles que parecen ser estables y raramente se revierten en formas móviles. Los organismos no móviles carecen de flagelos.

Medios para la detección de movilidad

3. SIM

4. MIO

❖ Consistencia del medio

Semisólido en forma vertical

❖ Inoculación

Por picadura, en forma vertical

❖ Condiciones de incubación

Tiempo: 24 - 48 horas

Temperatura: 35 -37° C

❖ Reactivos adicionales

Prueba de indol

Reactivo de Kovacs

Adicionar 5 gotas y agitar suavemente el tubo
Interpretar inmediatamente.

Conservación: Los reactivos deberán guardarse en el refrigerador (4° C) mientras no se usen su estabilidad es variable, por lo tanto se hará todas las semanas un control de calidad, desechándolos si muestran una reacción débil o negativa con un organismo positivo conocido.

❖ Resultados



Figura 38. Pruebas bioquímicas del medio MIO

❖ Interpretación

1. Ornitina descarboxilasa

Positivo: color púrpura del medio

Negativo: Color amarillo en el fondo del tubo que puede ser púrpura al final.

2. Indol

Positivo: Anillo rojo en la superficie del medio.

Negativa: No se produce color

Negativa: Color naranja en la superficie del medio.

Indica desarrollo de escatol, un compuesto metilado que puede ser el precursor de la formación de indol.

La reacción positiva después de 24 horas indica una prueba completa.

Si el cultivo de 24 horas es negativo deberá incubarse otras 24 horas y repetirse la prueba.

3. Movilidad

Positiva. Los organismos móviles migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbiedad.

Negativa. Crecimiento bacteriano acentuado siguiendo la línea de siembra.

Se leen las reacciones de movilidad y de ornitina descarboxilasa antes de agregar el reactivo de Kovacs para la prueba de indol.

❖ Reporte de resultados

Prueba	Movilidad	Indol	Ornitina
Positivo	+	+	+
Negativo	-	-	-

Tabla 6. Reporte de resultados del medio MIO

❖ Aplicaciones

❖ Microorganismos ornitina positivos

- Especies de *Enterobacter*
- *Proteus mirabilis*
- *Proteus morganii*
- *Yersinia enterocolitica*

❖ Microorganismos ornitina negativos

- Especies de *Klebsiella*
- *Enterobacter agglomerans*
- *Proteus vulgaris*
- *Proteus rettgeri*
- *Yersinia pestis*
- *Yersinia pseudotuberculosis*

Bacterias	Producción de indol	Movilidad	Producción de H ₂ S
<i>Salmonella typhi</i>	-	+	+ 0 -
Otras <i>Salmonellas</i>	-	+	+ 0 -
<i>E. coli</i>	+	+ 0 -	-
<i>Klebsiella</i>	+ 0 -	-	-
<i>Enterobacter</i>	-	+	-
<i>Citrobacter</i>	-	+	+
<i>Shigella</i>	+ 0 -	+ 0 -	-

Tabla 7. Aplicaciones de la Prueba bioquímica MIO

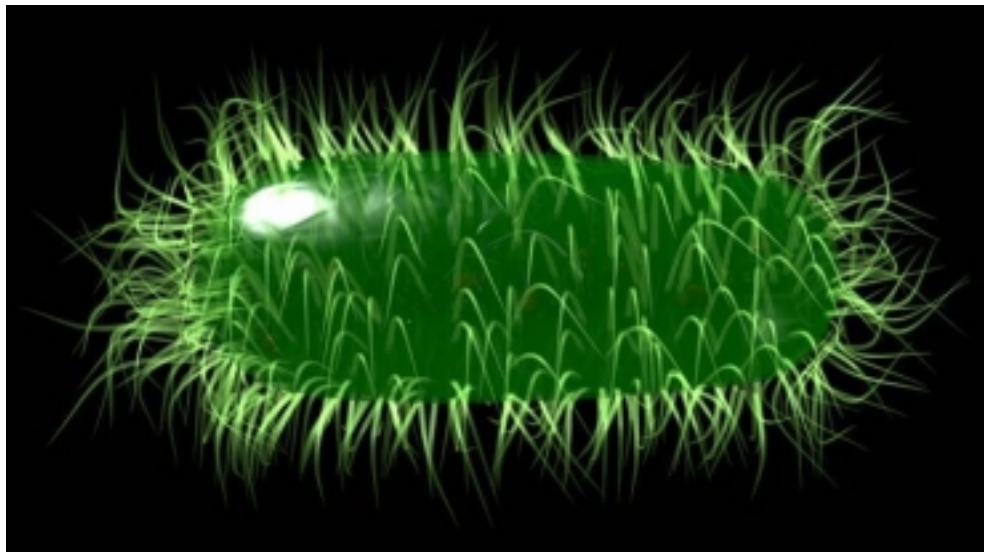


Figura 39. *Shigella*

METABOLISMO

El metabolismo se define como una serie de reacciones químicas que se llevan a cabo en el microorganismo de tipo fisiológico para que se adapte al medio.

Las funciones específicas del metabolismo son cuatro:

1. Obtención de energía química de las moléculas combustibles.
2. La conversión de principios nutritivos exógenos en sillares de construcción o precursores de los componentes macromoleculares de la célula.
3. El ensamblaje de estos materiales para formar, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros componentes celulares.
4. La formación y degradación de las biomoléculas necesarias para las funciones especializadas de las células.

Anabolismo: Síntesis de macromoléculas (cápsulas, membranas, proteínas, etc).

La biosíntesis de las moléculas orgánicas a partir de estos, precisa del consumo de energía química aportada por el ATP generado durante el catabolismo.

Catabolismo: Degradación o rompimiento de moléculas grandes (glúcidos, lípidos y proteínas), se degradan para producir moléculas más sencillas.

El catabolismo va acompañado de la liberación de la energía química inherente a la estructura de las moléculas orgánicas o nutritivas y a su conservación en forma de ATP.

Las células pueden dividirse en dos grandes grupos según la forma química del carbono que precisan tomar del entorno:

- ❖ **Autótrofas:** (auto alimentadas), pueden utilizar el CO_2 como fuente única de carbono y construir a partir de él los esqueletos carbonados de todas sus biomoléculas orgánicas.
- ❖ **Heterótrofas:** (alimentadas de otros), que no pueden emplear el CO_2 y tienen que obtener el carbono de su entorno en una forma reducida relativamente compleja, tal como la glucosa.

El segundo criterio por el que pueden clasificarse las células es la naturaleza de su fuente de energía:

- ❖ **Fotótrofas.** Células que emplean la luz como fuente de energía.
- ❖ **Quimiotrófas.** Las que emplean energía de las reacciones de oxidación-reducción.

- **Quimiorganótrofos.** Quimiotrófos que necesitan moléculas orgánicas complejas como dadores electrónicos, tales como glucosa.
- **Quimiolitótrofos.** Organismos que pueden emplear dadores electrónicos inorgánicos sencillos, tales como el hidrógeno, sulfuro de hidrógeno, amoniaco o azufre.

Los **heterótrofos** pueden dividirse en las siguientes clases:

- ❖ **Aerobios.** Emplean oxígeno molecular como último aceptor de electrones en sus dadores electrónicos orgánicos.
- ❖ **Anaerobios.** Emplean como aceptor electrónico alguna otra molécula en lugar del oxígeno.
- ❖ **Facultativos.** Células que viven en condiciones ya sean aeróbicas o anaeróbicas.
- ❖ **Anaerobios estrictos.** Células que no pueden utilizar el oxígeno en ninguna circunstancia.

Hay dos grupos principales de bacterias: las saprofitas, que viven sobre los cuerpos muertos de animales y vegetales, y las simbiontes, que viven en animales o plantas vivas. Las saprofitas son importantes porque descomponen los cuerpos de las plantas y animales muertos en sus componentes esenciales, haciéndolos accesibles para ser utilizados como alimento por las plantas.

Muchas bacterias simbiotes se encuentran, en condiciones normales, en los tejidos humanos, incluso en el tubo digestivo y la piel, donde pueden resultar indispensables para los procesos fisiológicos. Este tipo de relación recibe el nombre de *mutualismo*. En el *comensalismo*, las bacterias simbiotes obtienen los nutrientes de sus huéspedes vivos causándoles un daño considerable. Los *parásitos*, el tercer tipo, pueden provocar la destrucción de las plantas o de los animales en los que viven.

Por lo general las macromoléculas son hidrolizadas en el exterior de la célula por la acción de exoenzimas y son introducidos en la célula en forma de monómeros o de dímeros.

Las hexosas tras unos pasos previos de transformación son hidrolizados en dos mitades; los productos de esta hidrólisis se convierten en ácido pirúvico; éste último ocupa un lugar clave en el metabolismo intermediario y constituye el punto de partida de numerosas vías anabólicas y catabólicas.

PRODUCCIÓN DE ENERGÍA

Las células en crecimiento requieren una provisión constante de energía metabólica, en una forma que pueda ser usada para la biosíntesis. El mundo microbiano ha desarrollado modelos productores de energía extraordinariamente

diversos. Algunos de ellos usan donantes de electrones inorgánicos y varios aceptores de electrones (oxígeno, nitratos, sulfatos) para proporcionar energía destinada a formar sus propios constituyentes orgánicos a partir del CO_2 .

El fin primordial de la degradación de los sustratos consiste en obtener energía (ATP). Las reacciones que van acompañadas de una obtención de energía son reacciones oxidativas. Las células se liberan del carbono oxidado en forma de anhídrido carbónico, los distintos microorganismos utilizan diferentes caminos para eliminar el hidrógeno que se va formando de manera constante (NADH_2), esto es, para regenerar el NAD. Según sea el aceptor final de H^+ se diferencian la respiración, la fermentación y la respiración anaeróbica.

VÍAS DE DEGRADACIÓN DE LAS HEXOSAS

Rutas catabólicas:

- Glucólisis
- Pentosa fosfato
- Entner-Duodoroff

I . Glucólisis

Se refiere a la degradación de la glucosa hasta piruvato. La glucólisis puede ocurrir en condiciones aerobias o anaerobias. En aerobiosis generalmente funciona en conjunto con el ciclo de Krebs en el cual el piruvato se oxida hasta CO_2 y agua. En anaerobiosis el piruvato se lleva a la fermentación.

En la glucólisis ocurren dos fosforilaciones a nivel del sustrato:

- 1) En el paso de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato en donde se sintetiza un ATP.
- 2) En el último paso de la vía, en la transformación de fosfoenilpiruvato a piruvato, en donde se forma otro ATP.

Secuencia de reacciones en la glucólisis

En conjunto, la ecuación de la glucólisis para producir lactato es la siguiente:



Aunque las etapas intermedias implicadas son muchas y complejas, una visión simplificada podría describir el proceso como:

1. La incorporación inicial de dos grupos fosfato dentro de la molécula de glucosa de seis átomos de carbono. Los grupos fosfato los proporcionan dos moléculas de ATP, mediante la utilización de energía.
2. El compuesto intermedio de seis átomos de carbono que se forma, fructosa 1,6-difosfato, se rompe en dos compuestos más simples, con tres átomos de carbono cada uno.
3. Estos compuestos de tres átomos de carbono, fosfato de dihidroxiacetona y gliceraldehído-3-fosfato, son cada uno metabolizados para dar piruvato, en una vía con numerosos pasos intermedios. Durante este proceso, cada uno de los compuestos de tres átomos de carbono produce dos moléculas de ATP que se utilizaron en la etapa 1. Además se producen dos moléculas del cofactor intermediario NADH, las cuales pueden ser oxidadas bajo condiciones aerobias, en una ruta separada que rinde seis moléculas de ATP. De esta forma, la glucólisis puede producir seis moléculas de ATP por cada molécula de glucosa cuando hay oxígeno disponible, pero sólo dos moléculas de ATP bajo condiciones con déficit de oxígeno.
4. Las dos moléculas de piruvato resultantes pueden ser utilizadas por el ciclo mitocondrial del ácido cítrico después de convertirse en acetil-CoA produciendo

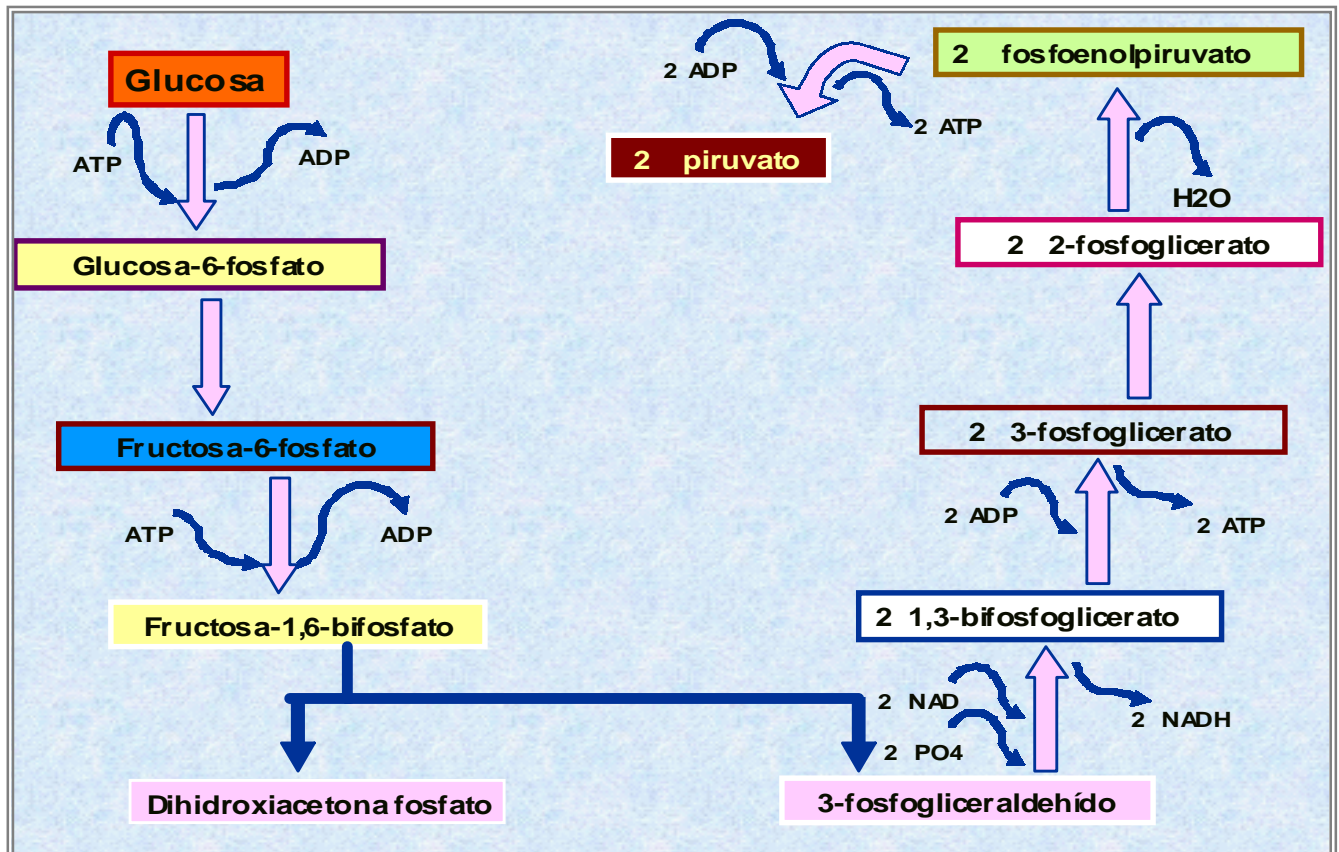
otras 30 moléculas de ATP. En resumen, se pueden producir un total de 36 moléculas de ATP mediante el metabolismo completo de molécula de glucosa bajo condiciones aerobias, pero sólo dos moléculas de ATP bajo condiciones anaerobias.

5. Por último, una de las moléculas intermediarias de tres átomos de carbono, el gliceraldehído-3-fosfato puede en una reacción lateral, convertirse en 2,3-difosfoglicerato.

Todas las reacciones del sistema son fácilmente reversibles, con la excepción de tres de ellas: la fosforilación de la glucosa catalizada por la hexocinasa, la de la fructosa-6-fosfato catalizada por la fosfofructocinasa y la conversión de fosfoenolpiruvato en piruvato catalizada por la piruvato cinasa.

La coenzima esencial NAD (dinucleótido de adenina y nicotinamida) es necesaria para un proceso de conversión enzimática en la formación del piruvato. Cuando el oxígeno es deficiente, esta coenzima sólo puede regenerarse por reoxidación del NADH en presencia de oxígeno, produciendo NAD, energía y agua. La glucólisis puede continuar en condiciones anaerobias en la formación de lactato y la regeneración del NAD, pero a cambio de producir menos energía por molécula de glucosa metabolizada.

GLUCÓLISIS



Esquema 1. Glucólisis

11. Ruta de Entner-Duodoroff

- En esta vía se produce sólo una molécula de ATP por cada molécula de glucosa.
- Sus productos finales son piruvato y gliceraldehído-3-fosfato.
- Esta vía es mucho menos usada por los microorganismos que la ruta de la glucólisis.
- Es más rápida que la glucólisis por la menor cantidad de reacciones que se llevan a cabo.

En esta vía la glucosa 6-fosfato sufre en primer lugar una deshidrogenación y se convierte en 6-fosfogluconato. Por la acción de una 6-fosfogluconatodeshidrogenasa se pierde una molécula de agua y se forma ácido 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPG), el cual se divide por acción de una aldosa específica, en ácido pirúvico y 3-fosfogliceraldehído.

III. Hexosa monofosfato (ruta de pentosas- fosfato)

Aunque la glucólisis y el ácido del ciclo tricarboxílico son las principales vías catabólicas de la glucosa en la mayoría de los tejidos, algunas células poseen vías alternativas para producir metabolitos útiles a partir de la glucosa.

La vía hexosa monofosfato es de gran interés por ser la principal fuente de NADP reducido en el organismo (el NADP reducido participa en muchas reacciones de síntesis, aportando sus hidrógenos).

Esta vía comprende una serie de reacciones estrechamente conectadas con la glucólisis, ya que ambos procesos forman intermediarios comunes.

La vía puede dividirse en dos fases:

En la primera, la glucosa 6-fosfato sufre dos oxidaciones por deshidrogenación y una descarboxilación que la transforma en una pentosa fosfato. Se forma ribulosa-5-fosfato y se libera CO_2 y con la formación de la ribulosa 5-fosfato se pone fin al verdadero proceso oxidativo.

En la segunda fase la ribulosa-5-fosfato da lugar a dos isómeros distintos. Ésta junto con la xilosa-5-fosfato se combina para formar una triosa-fosfato y una heptosa-fosfato, las cuales a su vez darán una hexosa-fosfato y una triosa fosfato.

En un ciclo que permite la oxidación completa de los carbohidratos no parece operar en su forma completa en sistemas microbianos anaerobios.

En esta ruta se forman pentosas y luego estas se rompen en unidades de 3 y 2 carbonos, dando lugar a lactato y etanol. El rendimiento neto en la vía de las HMP es de una molécula de ATP por cada molécula de glucosa catabolizada.

Es la única vía o fuente de D-ribosa para la síntesis de nucleótidos. Se lleva a cabo en el citoplasma; todas las enzimas que intervienen son solubles.

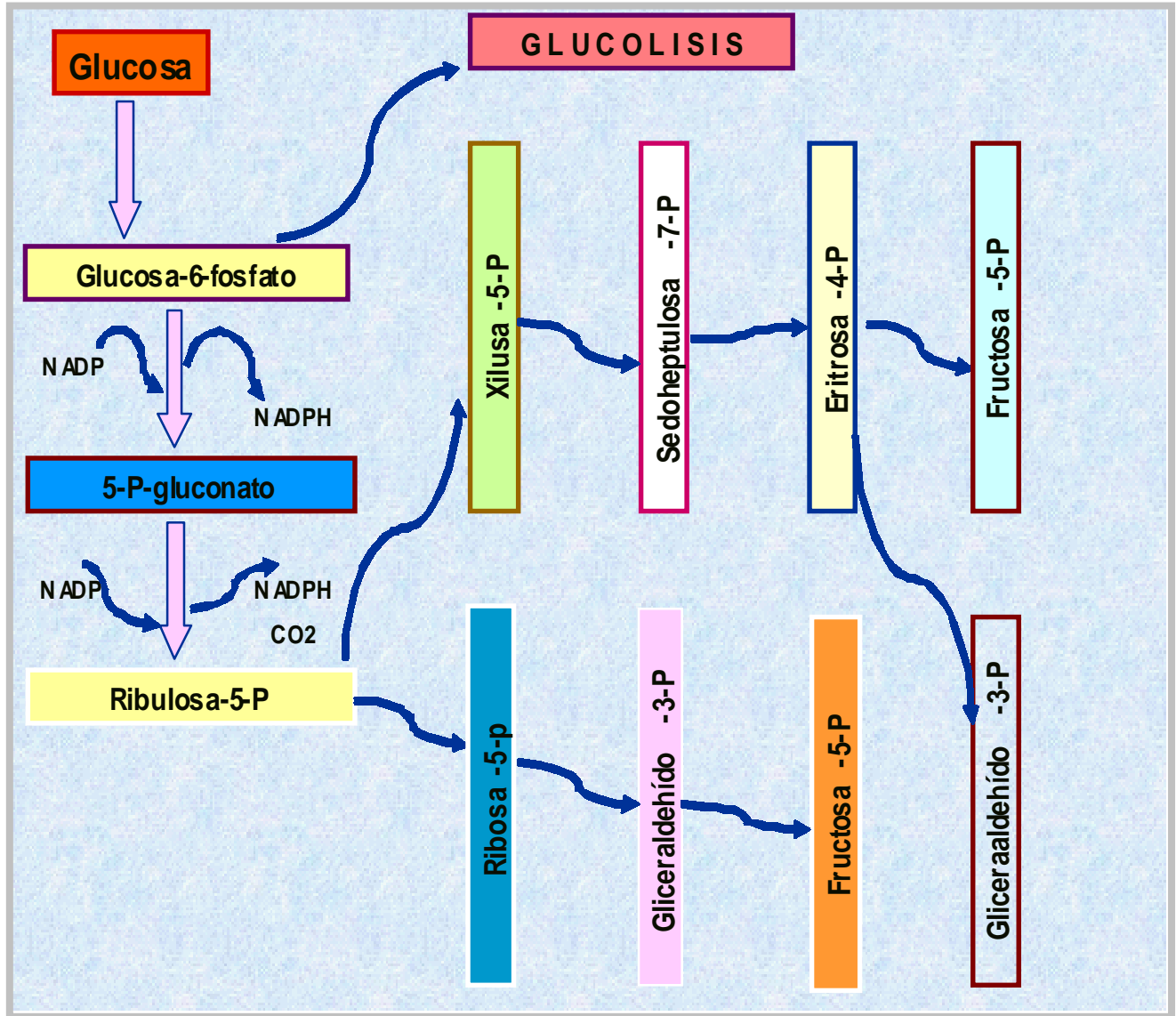
Es una vía energética para microorganismos aerobios facultativos.

Sus funciones metabólicas son diversas pero se resumen en lo siguiente:

1. Es una vía alternativa de degradación de la glucosa para obtener ATP acoplada con la fosforilación oxidativa.
2. Es la fuente principal, sino la única, de NADPH citoplasmático en células eucarióticas como fuente de poder reductor, el cual es necesario para la biosíntesis de ácidos grasos y otros procesos como la reducción del glutatión, la biosíntesis de esteroides y las reacciones de hidroxilación.

3. Es la vía que proporciona pentosas fosfato para la síntesis de ribosa y desoxirribosa necesarias para la biosíntesis de ácidos nucleicos en general; además para la síntesis de histidina cuyo precursor es el fosforribosil pirofosfato, derivado de la pentosa.
4. Es la vía de degradación de la ribosa y la desoxirribosa, procedentes tanto de la digestión de ácidos nucleicos como del recambio metabólico de nucleótidos.
5. Es la ruta que conecta el metabolismo de las hexosas con el de otros azúcares, tales como arabinosa, y xilosa, componentes estructurales de glucoproteínas y paredes celulares de vegetales, así como principales fuentes carbonadas de muchas bacterias. Por otro lado la síntesis de ribulosa-5-fosfato, intermediario de la vía de las pentosas, es fundamental en las plantas verdes para llevar a cabo el ciclo de Calvin.
6. Es la fuente de un importante azúcar de cuatro carbonos, la eritrosa-4-fosfato, precursor para la biosíntesis de los compuestos aromáticos en bacterias y plantas.

VÍA HEXOSA FOSFATO



Esquema 2. Vía Hexosa - fosfato

CICLO DE KREBS

Es el proceso de la respiración mediante el cual, las células aeróbicas obtienen energía a partir de la oxidación de las moléculas combustibles por el oxígeno molecular.

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos es una secuencia de reacciones que tiene efecto en los organismos aeróbicos. Esta catalizada por un sistema multienzimático que acepta el grupo acetilo del acetyl CoA como combustible degradándolo hasta CO_2 y H^+ . Estos últimos son conductores a través de una secuencia de proteínas transportadoras de electrones hasta el oxígeno molecular, que se reduce para formar agua.

El piruvato ocupa una posición clave en las diferentes rutas de degradación de carbohidratos, es el principal producto de la glucólisis y puede sufrir una gran variedad de transformaciones, dependiendo de sí el organismo se encuentra en un ambiente aerobio o anaeróbico:

1. En aerobiosis el piruvato pasa al ciclo de Krebs.
2. En anaerobiosis puede ser transformado en alcoholes o ácidos.

Mediante la descarboxilación del ácido pirúvico se forman compuestos con dos átomos de carbono que se unen a continuación con la molécula aceptora adecuada (ácido oxalacético) y entrar a formar parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCC) y mediante una serie de reacciones

escalonadas son oxidados hasta anhídrido carbónico; los átomos de hidrógeno que se liberan en los pasos que suponen una deshidrogenación entran a formar parte de la cadena respiratoria productora de ATP (fosforilación oxidativa).

Sin embargo, entre los compuestos intermediarios del TCC se encuentran diversos ácidos orgánicos que constituyen los productos iniciales de varias cadenas biosintéticas (ácido alfa-cetoglutarico, ácido fórmico, ácido oxalacético).

El TCC no constituye únicamente una oxidación terminal de las sustancias nutritivas sino que es también un gran «pívor» y como tal también suministra los productos iniciales para la síntesis de los compuestos elementales de la célula. Si estos ácidos fuesen constantemente eliminados del ciclo, no podría regenerarse la molécula aceptora y el ciclo se detendría.

Mediante las denominadas reacciones complementarias (secuencias anapletóricas) se consigue que el número de compuestos intermediarios que se integran secundariamente al TCC iguale a la pérdida que ocasionan los procesos biosintéticos.

Oxidación completa

Se le conoce también como ciclo de los ácidos tricarboxílicos, sirve para la oxidación completa del piruvato y constituye un eslabón clave del metabolismo, ya que muchos de sus compuestos intermediarios pueden alimentar

rutas de biosíntesis de aminoácidos, piridinas, tetrapirroles y lípidos. Comprende la fase aeróbica de la oxidación de la glucosa y es donde se obtiene un mayor rendimiento de energía.

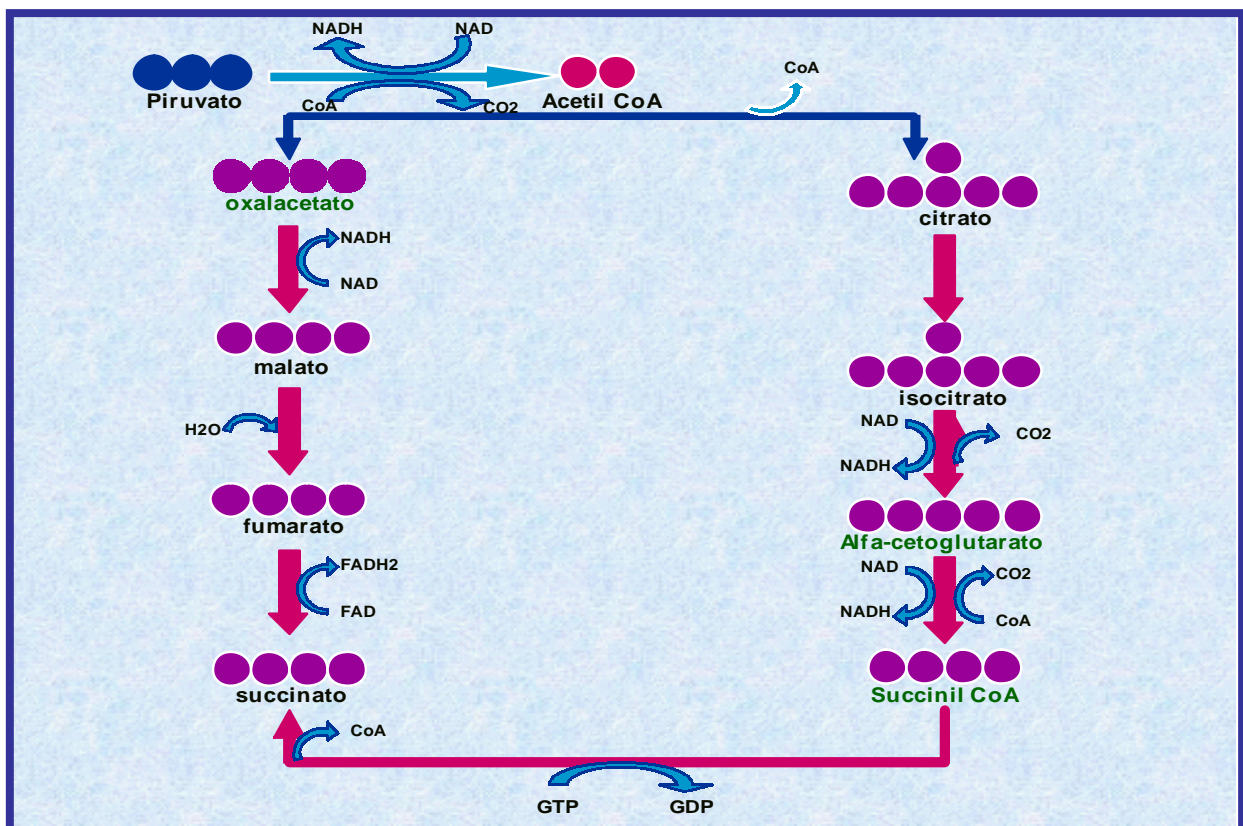
Sus productos finales son: CO_2 y H_2O . En el patrón más común el piruvato de la ruta glucolítica se oxida para dar origen a una molécula de acetil-CoA y CO_2 y la acetil-CoA se oxida en el ciclo de Krebs.

El balanceo neto de una molécula de glucosa que se ha oxidado por glucólisis primero y luego por el ciclo de Krebs es de 38 ATP.

Además de tener funciones degradativas, en el ciclo de Krebs se sintetizan sustancias que actúan como precursores de aminoácidos, pirimidinas y porfirinas.

CICLO DE KREBS

Esquema 3



METABOLISMO AEROBIO Y ANAEROBIO

Las bacterias se integran en varios grupos según el efecto del O_2 , sobre su crecimiento y metabolismo, estas propiedades son importantes para la patogenia y para el aislamiento e identificación de las bacterias.

FERMENTACIONES

En sentido estricto se designan fermentaciones aquellos procesos de consecución de energía en los que el hidrógeno pasa finalmente a un aceptor orgánico de electrones. El oxígeno no interviene en los procesos fermentativos.

El término fermentación hace referencia al metabolismo anaerobio de los hidratos de carbono.

En la fermentación el aceptor de electrones es un compuesto orgánico, mientras que en la respiración suele ser el oxígeno (respiración aerobia).

Cierto número de fermentaciones están basadas en la vía glucolítica (Embden Meyerhof). Esta vía genera ATP dos veces: primeramente a través de la oxidación del gliceraldehido-3-fosfato y de nuevo a través de la conversión del fosfoenolpiruvato.

1. Fermentación láctica

Es la fermentación más simple: Una reacción en un solo paso catalizado por la lacticodehidrogenasa ligada a ADN reduce el piruvato a lactato. No se forma gas. Dado que se consumen dos moléculas de ATP en la formación de hexosa difosfato a partir de glucosa y que se producen cuatro moléculas de ATP, el rendimiento neto son dos ATP por hexosa.

La fermentación homoláctica que forma solamente lactato.

- ❖ *Streptococcus lactis*
- ❖ *S. faecalis*
- ❖ *S. salivarius*
- ❖ *S. pyogenes*
- ❖ *S. cremoris*
- ❖ *S. thermophilus*
- ❖ *S. diacetylactis*
- ❖ *Lactobacillus lactis*
- ❖ *L. acidophilus*
- ❖ *L. bulgaricus*
- ❖ *L. casei*
- ❖ *L. plantarum*
- ❖ *L. inulinus*

Fermentación heteroláctica convierte solamente cada molécula de glucosa en lactato y producen además cantidades considerables de etanol, acetato y CO₂.

- ❖ *Leuconostoc mesenteroides*
- ❖ *Leuconostoc cirovorum*
- ❖ *Lactobacillus brevis*
- ❖ *Lactobacillus viridescens*

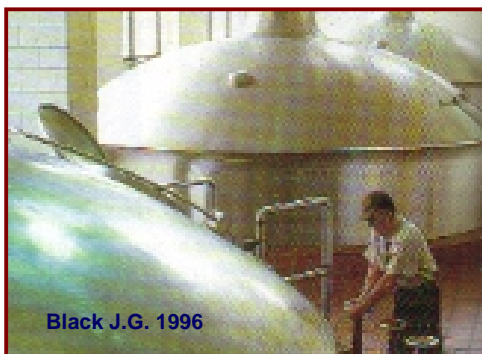
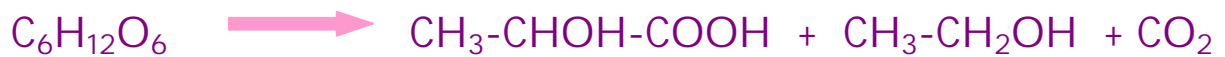


Figura 40. Producción de queso

2. Fermentación alcohólica

El piruvato se convierte en CO₂ más acetaldehído que después se reduce a etanol en una reacción ligada a NAD. Esta fermentación es rara en las bacterias como vía principal, es más bien característica en las levaduras.

El etanol es uno de los productos más extendidos entre los microorganismos resultantes de la fermentación de los azúcares. Los principales productores de etanol son las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*); el alcohol aparece también como producto secundario de la fermentación de las hexosas y de las pentosas en diversas bacterias anaerobias y aerobias facultativas.

La transformación del piruvato en etanol abarca dos pasos. En el primero el piruvato es descarboxilado en una reacción catalizada por la piruvatodescarboxilasa y en la que participa el tiaminpirofosfato dando acetaldehído, el cual es reducido con NADH_2 por la alcoholdehidrogenasa convirtiéndose en etanol.

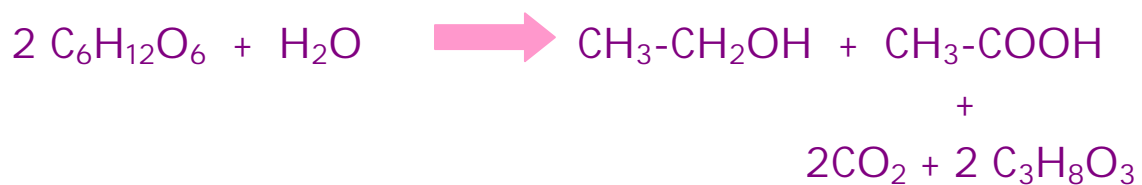


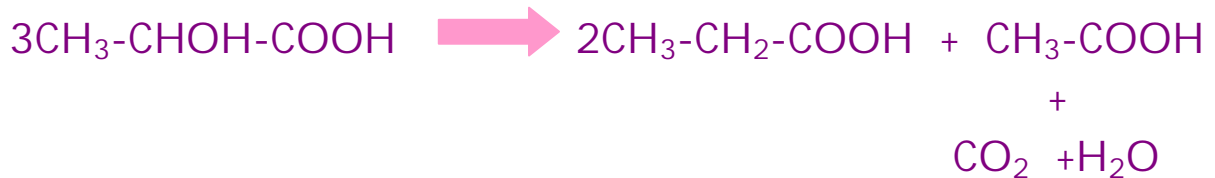
Figura 41. Producción de vino

3. Fermentación propiónica

Esta vía extrae energía adicional del sustrato. El piruvato es carboxilado para producir oxalacetato, que es reducido para proporcionar succinato y después es descarboxilado para proporcionar propionato.

- ❖ Género *Propionibacterium*
- ❖ *Clostridium propionicum*
- ❖ *Selenomonas ruminantium*

La producción de ácido propiónico a partir de ácido láctico se efectúa de acuerdo a la siguiente reacción:



La reducción del lactato o del piruvato a propionato se lleva a cabo con un complejo biotina-CO₂, el piruvato es carboxilado en primer lugar hasta oxalacetato y entonces es reducido hasta succinato pasando por malato y fumarato. El succinato es transformado en succinil-CoA de la forma habitual con la participación de ATP y de la CoA, posteriormente es transformado en metil-malonil-CoA en una reacción catalizada por la metil-malonil-CoA-isomerasa y en la que interviene también la vitamina B₁₂. El succinil-CoA es descarboxilado y el propionil-CoA es hidrolizado dando propionato y CoA.

La liberación de una molécula de CO_2 se lleva a cabo con ayuda de una transcarboxilasa que contiene biotina que lo transfiere nuevamente a piruvato.

4. Fermentación ácido mixta (fórmica)

Es característica de las Enterobacterias. Estos organismos utilizan su sustrato, parcialmente a través de una fermentación láctica, pero de modo principal a través de una fermentación caracterizada por el desdoblamiento del piruvato a formato y acetil CoA, a su vez éste último genera un ATP.

Producción de gas: El formato producido en este tipo de fermentación puede permanecer como tal siempre que el pH sea alcalino. Sin embargo en la mayoría de las fermentaciones, el pH se acidifica: al alcanzarse un pH igual o menor a 6.0 las bacterias productoras de gas producen una enzima, llamada hidrogenasa fórmica que convierte el ácido fórmico en CO_2 y H_2 . Las enterobacterias que no forman esta enzima producen ácido pero no gas.

La fermentación se lleva a cabo con la formación de gran número de compuestos en los que predominan los ácidos orgánicos; los productos más importantes de la fermentación son el ácido acético, fórmico, málico, láctico; etanol; glicerina; acetoína; 2,3- butanodiol, CO_2 e hidrógeno molecular.

5. Fermentación de metano: CO₂ como aceptor de hidrógeno

Las bacterias metánicas (*Methanobacterium*) son también organismos anaerobios obligados. Transforman los alcoholes y ácidos orgánicos en metano (CH₄) y CO₂, con lo que algunos ácidos orgánicos son parcialmente oxidados:



Se oxidan los ácidos grasos a hidratos de carbono a expensas del CO₂ a CH₄.

6. Fermentación butilenglicólica (acetoína)

El acetaldehído activo resultante no es oxidado, si no que se condensa con un piruvato. El producto de esta reacción es transformado en butilenglicol (butanodiol) en las reacciones siguientes, en las que los cuatro hidrógenos absorbidos equilibran los hidrógenos liberados en la producción de las dos moléculas de piruvato.

Esta fermentación al igual que la alcohólica, da solo productos neutros, formándose dos ATP por unidad de glucosa. Se denomina con frecuencia fermentación acetoínica debido a que con la exposición al aire se oxida parte del butilenglicol que se transforma en acetoína, la cual se reconoce con facilidad con una prueba específica: Voges-Proskauer.

El ácido butírico, butanol, acetoina, isopropanol, y otros ácidos orgánicos son productos típicos de la fermentación de los hidratos de carbono que llevan a cabo los productores anaerobios de esporas (*Clostridium*). Durante la fermentación se forman cantidades variables de ácidos, alcoholes, acetona y gas. Como sustratos se utilizan la glucosa y algunos polisacáridos, ácidos orgánicos y alcoholes.

El ácido butírico se forma por la condensación de dos moléculas de Acetil CoA, reacción catalizada por la enzima tiolasa. El acetil CoA es reducido a continuación con NADH_2 reacción catalizada por la beta-hidroxibutiril-CoA-deshidrogenasa, una flavoenzima, dando butiril-CoA. Mediante una desacilación se libera ácido butírico.

RESPIRACIÓN ANERÓBI CA CON ACEPTORES I NORGÁNICOS DE HI DRÓGENO

FIJACIÓN DE NITRÓGENO

El nitrógeno atmosférico se utiliza en primera instancia para la síntesis de biomoléculas. Sin embargo sólo un número relativamente pequeño de bacterias son capaces de utilizar el nitrógeno en esta forma. Las bacterias fijadoras de nitrógeno reducen nitrógeno molecular para sintetizar amoníaco.

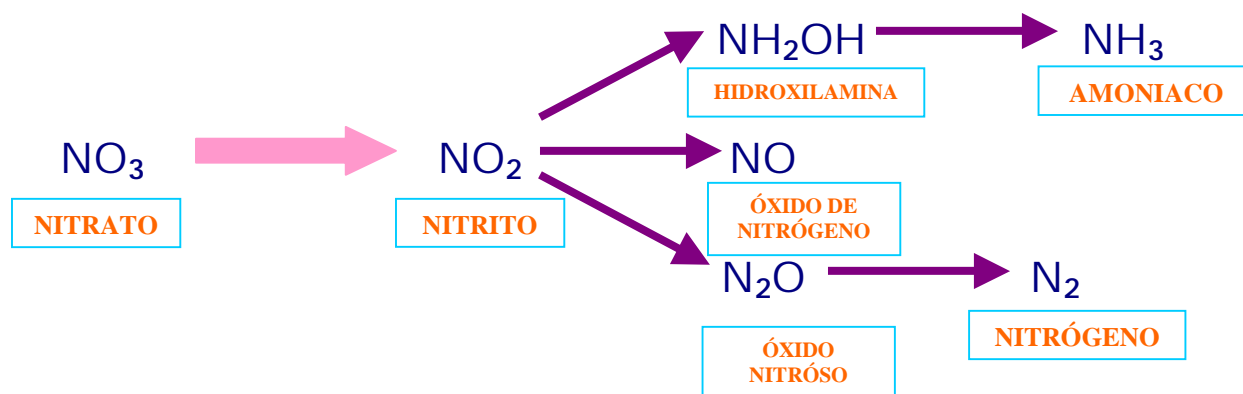
En cierta forma el sulfato y el nitrato actúan como transportadores de oxígeno el hidrógeno procedente del sustrato los reduce. La capacidad de transferir electrones al sulfato o al nitrato permite a las bacterias oxidar el sustrato incluso en ausencia de oxígeno molecular y de esta forma obtener más energía que por simple fermentación.

Reducción de nitratos

La reducción de nitratos tiene en las bacterias dos destinos diferentes: asimilación y desasimilación.

En el primer caso ocurren una serie de reducciones desde nitratos hasta nitritos y amoníaco. Este último se utiliza para la síntesis de aminoácidos, proteínas y bases nitrogenadas, entre otros compuestos.

En el segundo caso los nitratos se utilizan como aceptores de electrones; lo cual ocurre en la respiración anaerobia.



REDUCCIÓN DE SULFATOS

Varios Compuestos inorgánicos de azufre son aceptores de electrones en la respiración anaeróbica.

El sulfato la forma más oxidada del azufre, es uno de los aniones principales en el agua de mar y se utiliza por las bacterias reductoras de sulfato.

El producto final de la reducción del sulfato es el sulfito, un importante producto natural que participa en muchos procesos bioquímicos.

La mayoría de las plantas y los microorganismos utilizan el sulfato como fuente de azufre y obtienen el sulfuro necesario para la síntesis de los aminoácidos sulfurados por reducción asimilatoria de sulfato. Como producto secundario de esta reducción del sulfato aparece el sulfuro de hidrógeno:



Estas bacterias reductoras de sulfato, también llamadas desulfatizantes, son frente a los reductores de nitratos organismos anaerobios obligados y requieren condiciones estrictamente anaerobias.

El metabolismo de los desulfatizantes es oxidativo. Obtienen la energía por fosforilación oxidativa.

La reducción del sulfato se inicia en la célula mediante una activación del sulfato; por una ATP-sulfurilasa se intercambia el resto pirofosfato del ATP con el sulfato. El pirofosfato es hidrolizado por la pirofosfatasa. El adenosin-5-fosfosulfato (APS) es finalmente reducido con formación de sulfito y liberación de AMP.

Ejemplos de microorganismos que reducen el sulfato:

- ❖ *Desulfovibrio desulfuricans*
- ❖ *D. vulgaris*
- ❖ *Desulfotomaculum nigrificans*
- ❖ *D. orientis*
- ❖ *D. ruminis*

MÉTODOS PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

ENTEROBACTERIAS

Las enterobacterias más importantes se incluyen en la familia Enterobacteriaceae, la cual está constituida por bacilos Gram negativos. Hay especies móviles e inmóviles. Todas fermentan glucosa con producción de ácido y gas, reducen los nitratos a nitritos y dan resultado negativo en la prueba de indofenol oxidasa. Esta familia comprende bacterias patógenas y no patógenas. Conviene recalcar que las características de patogenicidad relativa en las enterobacterias en su hábitat natural, que es el tracto gastrointestinal, se modifican radicalmente cuando estas bacterias alcanzan una localización extra intestinal, en sitios como el tracto genitourinario, líquido cefalorraquídeo, torrente sanguíneo, médula ósea o la cavidad peritoneal.

En vista de lo anterior, es posible aislar y cultivar miembros de la familia Enterobacteriaceae tanto a partir de muestras fecales y productos que pudieron haber sufrido una contaminación fecal como el agua, alimentos, utensilios, etc.

Es muy importante recordar que las muestras de cualquier tipo que se envían al laboratorio para investigar la presencia de estas bacterias, deben ser colectadas en condiciones asépticas transportadas y procesadas con la mayor rapidez, a fin de evitar alteraciones de muestras y pérdida de viabilidad de las bacterias que se buscan, o crecimiento excesivo de gérmenes banales que pudieran entorpecer el estudio.

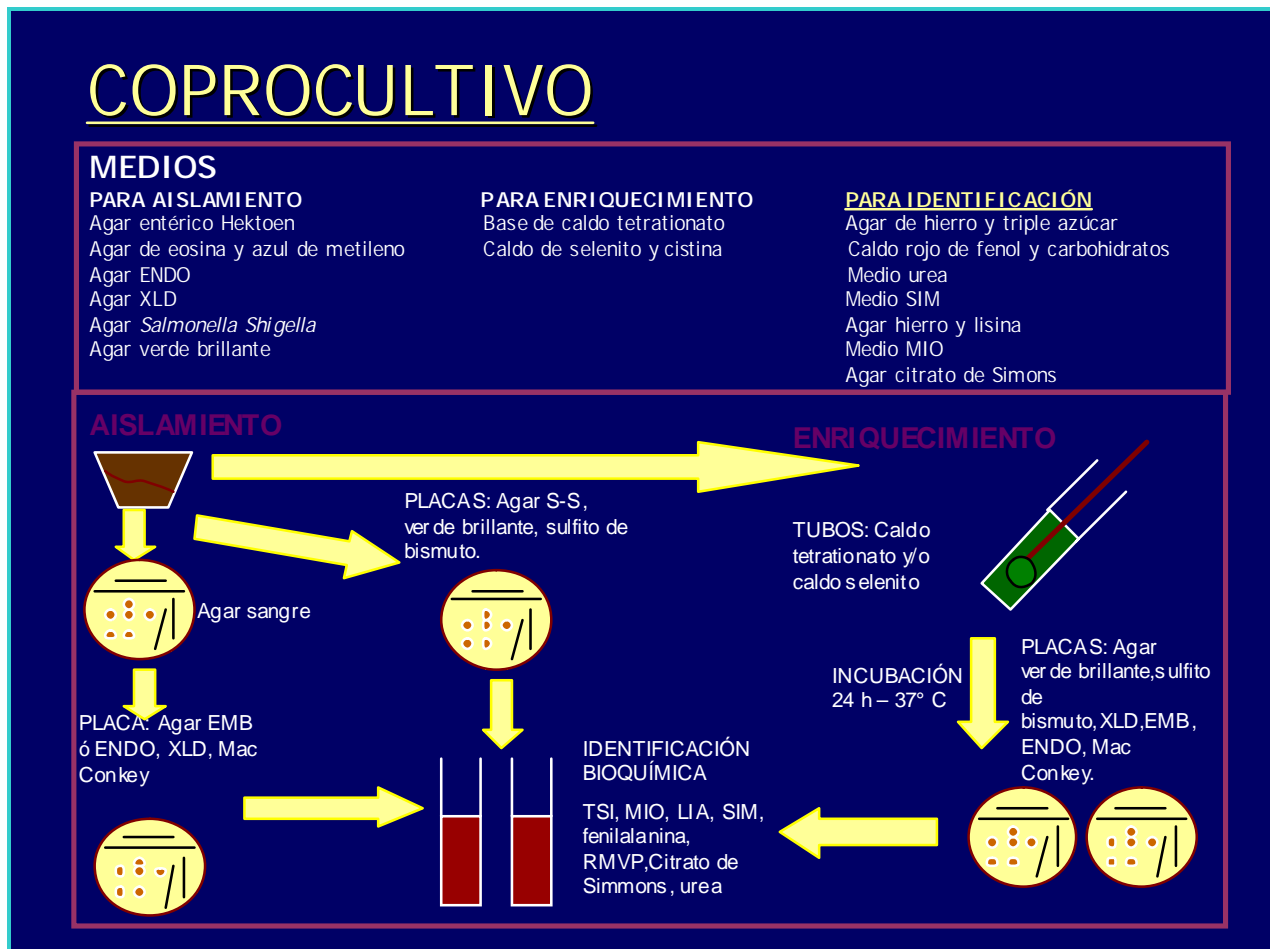
BACTERIA	OXIDASA	INDOL	VP	RM	CITRATO	SH2	UREA	MOVILIDAD	GELATINA	LISINA DESC.	ARGININA DESC.
<i>E. Coli</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Edwardsiella</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Salmonella</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>Arizona</i>	--	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Citrobacter</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>Enterobacter</i>	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>Serratia</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Providencia</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-

Tabla 8. Características bioquímicas de bacilos Gram negativos

COPROCULTIVO

En cualquier caso, es importante contar con procedimientos de laboratorio bien controlados que permitan detectar la presencia de agentes patógenos o bien dar alguna información sobre alteraciones en el equilibrio de la flora normal.

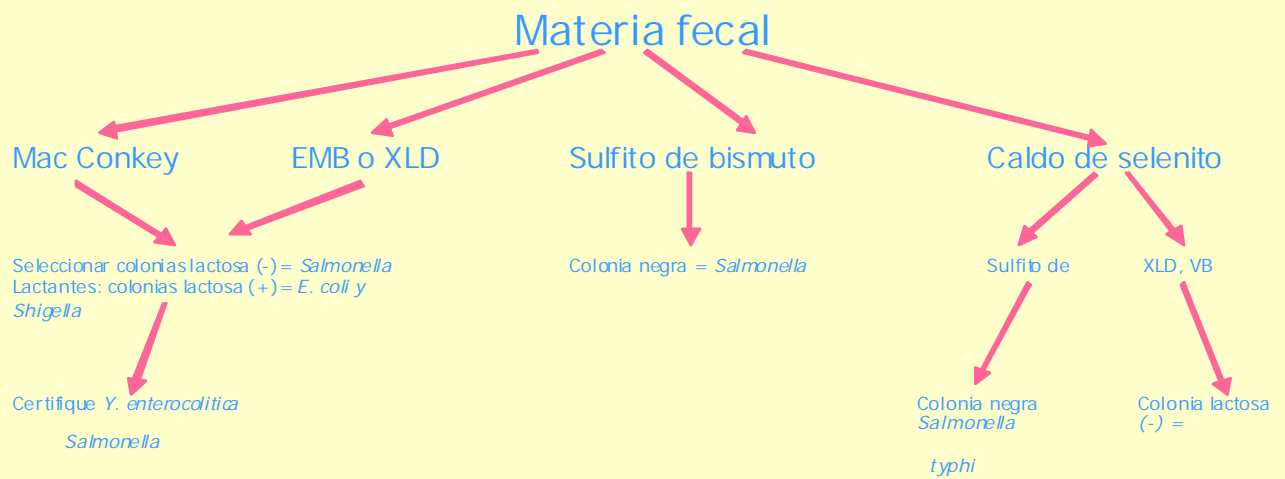
El esquema que se propone en éste atlas para aislamiento e identificación de enterobacterias patógenas figura entre numerosas variantes de trabajo utilizadas por diferentes autores. Se considera que este esquema es uno de los más usuales y que puede dar resultados consistentes y satisfactorios.



Esquema 4. Coprocultivo

Aislamiento de bacterias patógenas en heces

Salmonella, Shigella, E. coli, Y. enterocolitica



Esquema 5. Aislamiento de bacterias patógenas de heces

FAMILIA MICROCOCACEAE

CARACTERÍSTICA	<i>MICROCOCCUS</i>	<i>STOMATOCOCCUS</i>	<i>PLANOCOCCUS</i>	<i>STAPHYLOCOCCUS</i>
Racimos irregulares	+	+	+	+
Tétradas	+	-	-	-
Cápsula	-	+	-	-
Movilidad	-	-	+	-
Crecimiento G-furazolidona	+	-	-	-
Fermentación de glucosa	-	+	-	+
Oxidasa	+	-	No desarrolla	-
Resistencia de lisostafina	R	R	R	S
Glicina de péptido-glicana	-	-	-	+
Ácidos teicoicos en pared celular	-	-	-	+

Tabla 9. Características bioquímicas de la Familia *Micrococcaceae*

ESTAFILOCOCOS

El estafilococo es un microorganismo poco exigente y de fácil desarrollo. En los medios no selectivos sus colonias son grandes, opacas, lisas, circulares y enteras. A veces pueden presentar bordes ligeramente ondulados, coloración amarilla o blanca.

En agar sangre las colonias tienen los caracteres anteriormente mencionados y pueden además presentar hemólisis. La mayor parte de las cepas virulentas son hemolíticas, fermentan manitol, resisten altas concentraciones de cloruro de sodio y generalmente producen pigmento dorado, aunque otras cepas virulentas son blancas carecen de pigmento.

La mejor prueba de virulencia es la facultad que tiene de coagular el plasma (estafilococos coagulasa positivos).

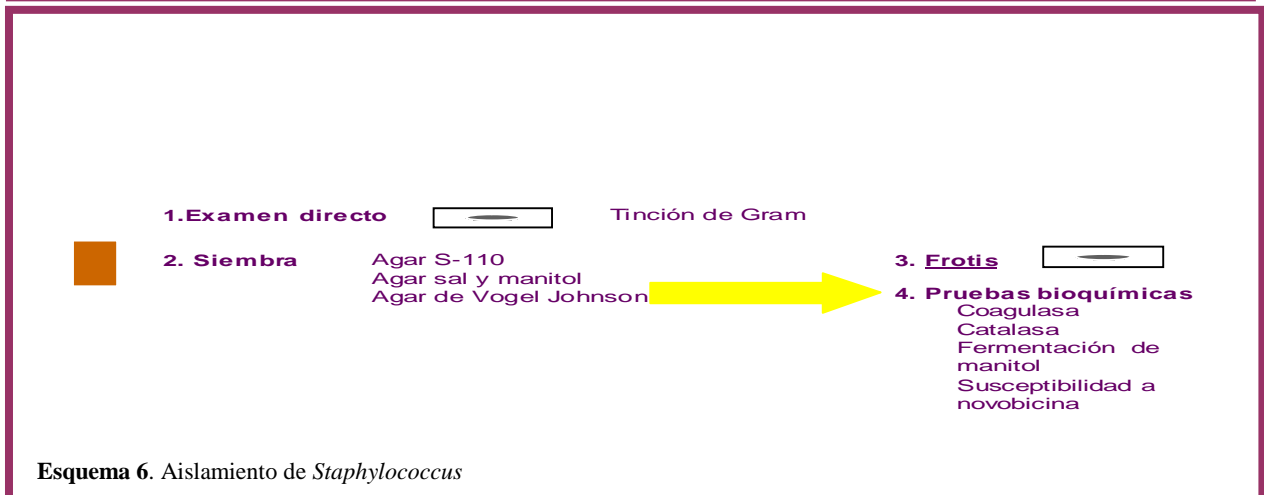
MEDIOS

PARA AISLAMIENTO

Agar S-110
Agar sal y manitol
Agar de Vogel Johnson

PARA IDENTIFICACIÓN

Medio CTA
Caldo rojo de fenol
Caldo SF



PRUEBA	<u>S. aureus</u>	S. epidermidis	S. saprophyticus
Pigmento colonial	+	-	10-90% cepas +
Coagulasa	+	-	-
Factor de agregación	+	-	-
Nucleasa termoestable	+	-	-
Fosfatasa alcalina	+	+	-
Ornitina descarboxilasa	-	10-90% cepas +	-
Ureasa	10-90% cepas +	+	+
Beta-galactosidasa	-	-	+
Producción de acetoina	+	+	+
Resistencia a novobiocina	-	-	+
Resistencia a polimixina	+	+	-
Trehalosa	+	-	+
Manitol	+	-	10-90% cepas +
Manosa	+	+	-
Xilosa	-	-	-
Celulosa	-	-	-
Maltosa	+	+	+
Sacarosa	+	+	+

Tabla 10. Características bioquímicas de *Staphylococcus*

ESTREPTOCOCOS

El estreptococo puede estar presente en grandes números como componentes de la flora normal, pero bajo ciertas circunstancias puede estar asociado con infecciones o ser el responsable principal de las mismas.

Los estreptococos más importantes generalmente pueden demostrarse por la producción de hemólisis en los medios que contienen sangre.

Los *Streptococcus* del grupo A son beta hemolíticos y se aíslan generalmente de exudados faríngeos. Sin embargo, entre la flora existen diversos tipos de estreptococos, los cuales pueden ser alfa o beta hemolíticos es necesario efectuar otras pruebas para identificarlos, tales como la composición antigénica y la prueba de sensibilidad de bacitracina.

En agar sangre las colonias de esta bacteria son pequeñas, elevadas, de color blanco a gris, duras y secas con un halo claro bien definido de hemólisis completa (hemólisis beta).

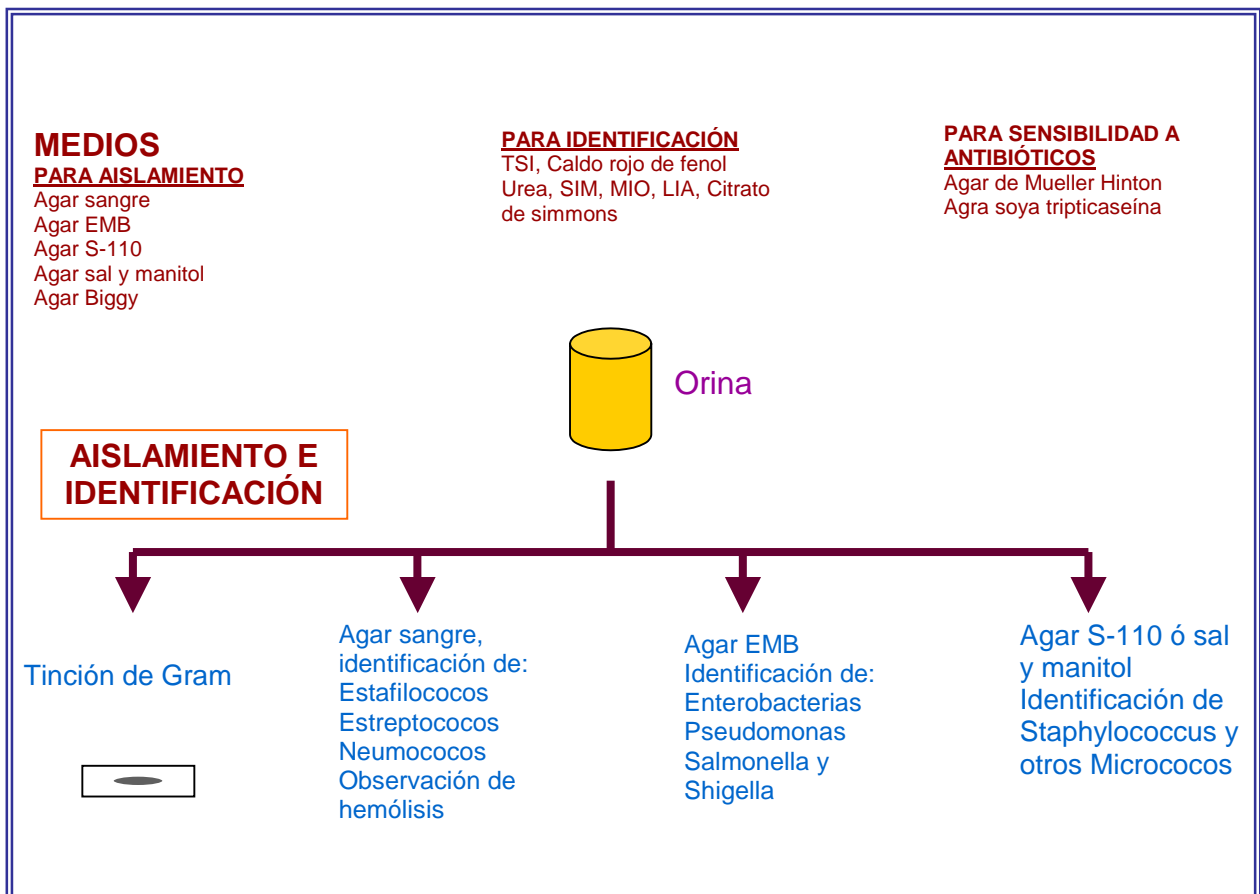
Especie	Susceptibilidad bacitracina	Susceptibilidad optoquina	Hidrólisis hipúrate	Hidrólisis esculina	Crecimiento en bilis	Crecimiento en NaCl 6.5%	CAMP	Fenómeno satelitismo
<u>Estreptococos</u>								
<u>beta-</u> <u>hemolíticos</u>								
Grupo A	S	R	+	-	-	-	-	-
Grupo B	R	R	-	+	-	+	+	-
Enterococos	R	R	+	-	+	+	-	-
No enterococos	R	R	-	-	+	-	-	-
<i>S. viridans</i>	R	R	-	-	-	-	-	+
<u><i>S.</i></u> <u><i>pneumoniae</i></u>	R	R	-	-		-	-	-

Tabla 11. Características bioquímicas de *Streptococcus*

UROCULTIVO

El urocultivo debe hacerse cuando hay signos o síntomas de infección urinaria, insuficiencia renal o hipertensión. Llevándolo a cabo siempre en personas en que se sospecha infección sistémica o que presenten fiebre de origen desconocido.

Las infecciones agudas o crónicas pueden afectar en forma ascendente desde la uretra hasta los riñones, especialmente cuando se trata de una invasión por la flora normal del tracto genitourinario que al actuar sobre el mismo provoca una acción patogénica importante.



Esquema 7. Urocultivo

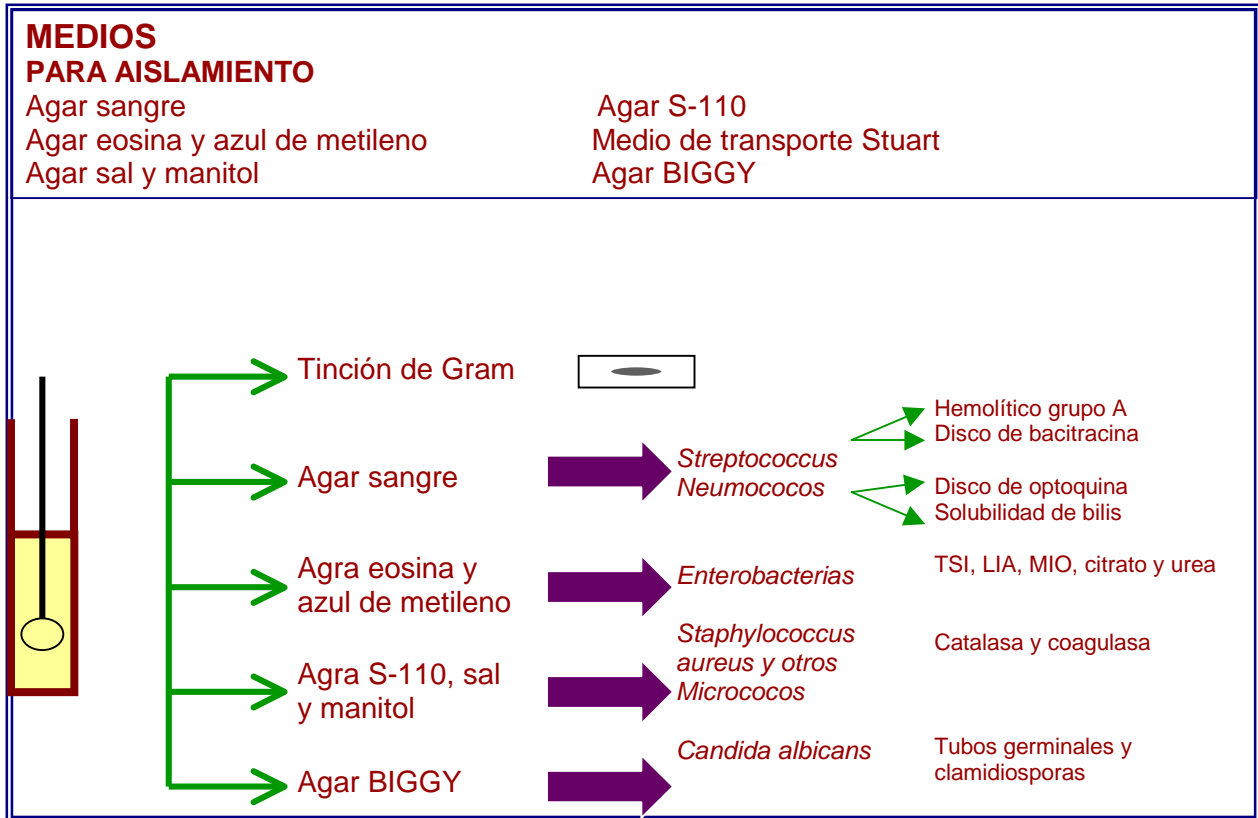
HEMOCULTIVO

En el paciente con fiebre, con o sin signos o síntomas de localización el hemocultivo es la prueba más útil y más usada para demostrar la frecuencia de infección sistémica. La demostración de bacteremia es también esencial en las personas en que se sospecha endocarditis bacteriana.

Es importante conocer las infecciones en las que se pueden aislar microorganismos de la sangre. Entre estos se encuentran la fiebre tifoidea, neumonías, meningitis, endocarditis bacteriana, osteomielitis, peritonitis, etc.

La posibilidad de obtener cultivos positivos depende de la etapa de la enfermedad en que se tome la muestra y el grado de evolución de la misma. En la mayoría de los casos, por lo general es conveniente tomar varias muestras a intervalos apropiados ya que un solo cultivo puede ser insuficiente.

EXUDADO FARINGEO



Esquema 8. Exudado faringeo

B I B L I O G R A F Í A

AMPMPM, 1981, Microbiología médica, UNAM, México, pp 190-548.

Bailey and Scot's, 1985, Diagnostic microbiology, Mosby, four edition, España, pp 118-446.

Baker, F. J. Breach M. R, 1990, Manual de técnicas de microbiología médica, tercera edición. Acribia, España, pp 69-215.

Balows A, Hausler W. J. Hermann K. L. Isenberg H. D, Shadomy H. J, 1991, Manual of clinical microbiology, quinta edición, American society for microbiology, USA, pp 67-73.

Bernard D. D, Renato D., Herman N. E., 1985, Tratado de microbiología, Tercera edición, Salvat, España, pp 201.

Black J. G, 1996, Microbiology, principles and applications. Tercera edición, Prentice Hall, USA, 790 pp.

Brock D. T, 1996, Microbiología, Sexta edición, Hispanoamericana, México, pp 100-135.

Cedric A. y Mims, 1995, Microbiología médica, Mosby, España, pp 132.

Collins C. H. y Lyne M. P, 1989, Métodos microbiológicos, Acribia, España, pp 35-56.

Cowan S.T, 1993, Manual for the identification of medical bacteria, Tercera edición, Cambridge University Press, Inglaterra, pp 187-189.

Davis D, Dulbecco R, Eisen N. H, Ginsberg S. H, 1990, Tratado de microbiología. Tercera edición, Salvat, España, pp 156-185.

Delaat N. C. A, 1976, Microbiología, Interamericana, México, pp 39-52.

Delgado A, Amich S, Prieto S y Salve M. L, 1994, Laboratorio clínico de microbiología, Mc Graw hill, España, pp 51-78.

Duerden B. I. y Reid. T. M. S, 1993, Microbiología de enfermedades infecciosas, Limusa. México, pp 91-142.

Edwards & Ewing, 1961, Applied microbiology, Publishing Co, USA, pp 478.

Ewing & Edwards. 1986, Identification of Enterobacterias, cuarta edición. Publishing Co, USA, pp 376.

Finegold S. M y Baron E, 1996, Diagnóstico microbiológico, séptima edición, Panamericana, Argentina, pp 769.

Food and drug administration. Bacteriological analytical manual. 1976.

Granados P. R. y Ma. Del Carmen Villaverde P. M. C, 1997, Microbiología, Paraninfo, España, pp 35-42.

Hans G. Schlegel H. G, 1988, Microbiología general, Omega, Tercera edición, España, pp 75-43.

Ingraham L.J. y C. A. Ingraham, 1998, Introducción a la microbiología, Reverte, España, pp 751.

Rose H. A, 1977, Microbiología química, Alambra. España, pp 280-390.

Sneath P. H. A, Mair N. S, Sharpe M. E, Holt J. G, Bergey S, 1986, Manual of systemic bacteriology, Vol 2, The Williams & Wilkins Co, USA.

Tortora J. G, Berdell R, Funke y Case L. S, 1995, Microbiology and introduction, 15 edición, Benjamin / Cummings, USA, 841 pp.

DIRECCIONES ELECTRONICAS

Ambron S. y Hooper K, 2002.

<http://dis.unal.edu.co/eidos/node47.html>

Beyong, 2001.

http://beyond2000.com/news/Nov_00/story_901.html

Carolina Miyata, 2000.

<http://www.idg.es/canal/ShowID.asp?ID=7119>

Carolina Miyata, 1999.

<http://www.idg.es/canal/ShowID.asp?ID=5051>

Carruana L. B, 2002.

<http://members.tripod.com/~LouCaru/index-7.html>

Collage of San Francisco, 2002.

<http://www.missouri.edu/~mmiwww/slides.html>

Costa R. M, 2002. <http://www.nodo50.org/utla:/lectura.htm>

Custom Medical Stock, 1999. <http://www.cmsp.com>

EM Science, 2002. <http://www.emscience.com>,

EM Science, 2002.

http://www.emscience.com/literature/951053_Microbiology_Microbiology_Detection%5Eof%5EStaphylococci%5EPage1.asp

EM Science, 2002.

<http://www.emscience.com/literature/prodgroups.asp?category=Microbiology>

EM Science, 2002.

http://www.emscience.com/literature/951053_Sand.jpg

Guentzel M. N, 2002.

<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch026.htm>

Hans Knoll Institute, Jena Germany.

[http://www.bact.wisc.edu/Bact303/Bacteriology,,,Kenneth Todar,2002](http://www.bact.wisc.edu/Bact303/Bacteriology,,,Kenneth%20Todar,2002)

Harriet Thompson, 2002.

<http://www.medschool.lsumc.edu/Micr/COURSES/DMIP/dmex16.htm>

Immunity, 2002. <http://www.immunity.com/>

Medical Collage of Ohio, 2002.

<http://www.mco.edu/depts/micro/awards.html>

Merck, 2002.

http://www.merck.de/english/services/labor/l_uba/emibio/news/yersinia.html

Microbiologia clínica, 2000

<http://www.saudetotal.com/microbiologia/colcocos.htm#topo>

Microbial Systematics, 2002

http://www.umanitoba.ca/faculties/science/microbiology/staff/cameron/60_347.htm

Microbiology, 2002.

<http://www.austin.cc.tx.us/microbugz/labindex.html>

Microbiology, 2002.

<http://www.austin.cc.tx.us/microbugz/03morphology.html>

Microbiology, 2002.

<http://www.austin.cc.tx.us/microbugz/02aseptictrans.html>

Microbiology, 2002.

<http://www.austin.cc.tx.us/microbugz/06anaerobicjar.html>

Microbiology, 2002.

<http://www.austin.cc.tx.us/microbugz/mediaprep.html>

Microbiology, 2002. <http://www.austin.cc.tx.us/labindex.html>

Pfeizer, 2002

<http://www.pfizer.com/rd/microbes/salmonella.html>

Sarmiento A. D. y Torres L. M, 2002.

<http://dis.unal.edu.co/eidos/node47.html>

Science Service, 2002.

<http://www.sciencenews.org/20000603/bob1.asp>

Sullivan J. A, 2002. <http://www.cellsalive.com>

Todar K, 2002. <http://www.bact.wisc.edu/Bact303/Bacteriology>

University of Alaska, 2002.

<http://www.uaf.edu/coop-ext/efnep/foodsafety.html>

University of east Anglia Norwich, 2002
http://www.uea.ac.uk/menu/study_and_research/grad/pgprospectus_2002/schools/institute_of_food_research.html

University of Missouri-Columbia, 1998:
<http://www.missouri.edu/~mmiwww/slides.htm>

University of South Carolina, 2002.
<http://www.med.sc.edu:85/fox/enterobact.htm>

UNMH Hospitals, 2002.
<http://hospitals.unm.edu/uh/epidemiology/EngHandouts/EnglishMRSA.shtml>

UNAM, 2002. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>

World book, 1992.
<http://www.rush.edu/worldbook/articles/019000a/019000295.html>

<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>

http://endeavor.med.nyu.edu/courses/microbiology/courseware/infect-disease/Gram_Neg_Bacilli5.html

<http://catalog.cmsp.com/datav3/it010019.htm>

http://project.bio.iastate.edu/Courses/MIPM302/302new/6_3GPpositive.html

<http://ruv.itesm.mx>, 2002

<http://www.abc.net.au/science/news/default.htm>

<http://www.bact.wisc.edu/Bact303/Bacteriology>

<http://www.ccsf.edu/Departments/Biology/gmposcocci.htm>

<http://www.ccsf.edu/Departments/Biology/bactcell.htm>

<http://www.ccsf.edu/Departments/Biology/mscope.htm>

<http://www.ccsf.edu/Departments/Biology/metab.htm>

<http://www.ccsf.edu/Departments/Biology/growth.htm>

<http://www.ccsf.edu/Departments/Biology/gm-enterics.htm>

<http://www.ccsf.edu/Departments/Biology/endospores.htm><http://adl.cas.psu.edu/bacti.htm>

<http://www.ce.berkeley.edu/~nelson/ce210a/Salmonella/Salmonella%20Webpage.htm>

<http://www.holingerag.ch/labor/labor.html>

http://www.isis.rivm.nl/inf_bul/bul1302/voedselinfectie.html

<http://www.kenteliv.kent.edu/microbiology/microbiology%20slides.htm>

<http://www.medschool.lsumc.edu/Micr/COURSES/DMIP/dmex16.htm>

<http://www.mco.edu/depts/micro/awards.html>

<http://www.microscience.com/STM.htm>

<http://www.microbiologyonline.org.uk/about.html>

<http://www.mol.biol.ethz.ch/glockshuber/picturegallery/picturegallery.html>

<http://www.pasteur.fr/recherche/unites/scme/portfolio/bacteries/shigel1.htm>

http://www.quimica.matrix.com.br/images/salmonella_foto.jpg

<http://www.qualicon.com/baxgen.htm>

[http://www.ruv.mx/especiales/citela/documentos/programa/Carta\(main\)_files/modul](http://www.ruv.mx/especiales/citela/documentos/programa/Carta(main)_files/modul)

<http://www.saudetotal.com/microbiologia/colcocos.htm>

<http://www.saudetotal.com/microbiologia/labmicro.htm#1>. I solamento

<http://www.saudetotal.com/microbiologia/I>. isolamento

http://www.uphs.upenn.edu/bugdrug/antibiotic_manual/Gram3.htm

http://www.umanitoba.ca/faculties/science/microbiology/staff/cameron/60_347.htm

http://www.uvp5.univparis5.fr/UV_MED/AC/Intro.asp?NSuj=68&Intro=68-1

<http://www.santuarios.com/Editores/arboles.htm>

<http://www.santuarios.com/Editores/que-es.htm>

<http://biomedicas.unam.mx/htm/bmyt/mao/mao.htm>

<http://www.monografias.com/trabajos7/rumen/rumen.shtml>

<http://www.monografias.com/trabajos/bactevet/bactevet.shtml#arriba>

<http://www.monografias.com/trabajos/bactevet/bactevet.shtml>

<http://www.vdh.state.va.us/spanish/strepf.htm>

<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch021.htm>

<http://www.medmayor.cl/apuntes/farmacologia/farmacologiaI V.htm>

<http://www.vdh.state.va.us/spanish/shigf.htm>

http://www.seimc.es/control/revi_Bacte/Rshigella.htm

<http://www.vdh.state.va.us/spanish/botulismf.htm>

<http://www.jic.bbsre.ar.uk/science/molmicro/kpneu.html>

<http://www.delpaciente.com/htm/0273.htm>

<http://viarural.com.ar/viarural.com.ar/biomarketprincipal/calendariosanitarios/bovinos/infecciosas/clostridium/default.html>

<http://www.monografias.com/trabajos/bacterias/bacterias.shtm#arriba>

<http://www.hcg.udg.mx/pages/nuevo/servicio/coloyrecto/ligas.htm>

<http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/productos/586.htm>

<http://www.udh.state.va.us/spanish/ecolif.htm>

<http://www.monografias.com/trabajos/bacilosgram/bacilosgram.shtm/>

<http://escuela.med.pue.cl/paginas/publicaciones/AnatomiaPatologica/02Respiratorio/2neumonia.html>

<http://www.medconce.cl/revista/1997/1997num2/clinica.htm>

<http://www.vdh.state.va.us/spanish/typhoidf.htm>

<http://www.vdh.state.va.us/spanish/salmf.htm>

[http://www.run.itesm.mx/especiales/citela/documentos/programa/Casta\(main\)-files/modul-.htm](http://www.run.itesm.mx/especiales/citela/documentos/programa/Casta(main)-files/modul-.htm)

http://www.uea.ac.uk/menu/study_and_research/grad/pgprospectus_2002/schools/institute_of_research.html

http://www.quimica.matrix.com.br/images/salmonella_foto.jpg