

PRUEBAS DE ÓXIDO-FERMENTACIÓN (OF)

Interés: Consiste en conocer si los microorganismos actúan sobre los carbohidratos por vía oxidativa o por vía fermentativa.

Se pueden estudiar distintos azúcares, pero el más utilizado es la glucosa y así tenemos que:

- Las enterobacterias fermentan la glucosa (Ej. E. Colli)
- El Acinetobacter y la Pseudomona oxidan la glucosa.
- La Moraxella y Alcalígenes ni oxidan ni fermentan la glucosa, se les denominan no sacarolíticos.

Fundamento: Los microorganismos sacarolíticos degradan la glucosa fermentativa u oxidativamente. Los subproductos de la fermentación son ácidos mixtos, relativamente fuertes, que se pueden detectar en un medio de fermentación convencional.

En cambio, los ácidos formados por degradación oxidativa de la glucosa son muy débiles y para su detección se requiere un medio de OF más sensible, como es el medio de Hugh y Leifson (medio OF), caracterizado por poseer mayor cantidad de glucosa y una consistencia semisólida que permita la difusión por todo el medio de los ácidos formados en superficie, facilitando así la visualización del viraje del indicador de pH.

Este medio es también apto para determinar movilidad.

Preparación del medio: Se prepara en tubos siguiendo la técnica en general.

- Técnica:**
- 1.- Se requieren 2 tubos (por prueba OF)
 - 2.- Se realiza la siembra en picadura con hilo de platino, llegando casi al fondo del tubo.
 - 3.- Se cubre un tubo con una capa de 1 cm, aproximadamente, de parafina fundida estéril. El otro tubo se deja sin cubrir.
 - 4.- Se incuban ambos tubos a 35-37°C durante 48 h o más.

Interpretación: La producción de ácido se detecta en el medio por la aparición de color amarillo. Resumen de las posibles reacciones:

TUBO ABIERTO	TUBO CUBIERTO	TIPO DE METABOLISMO
Ácida (amarillo)	Alcalina (verde)	Oxidativo
Ácida (amarillo)	Ácida (amarillo)	Fermentativo
Alcalina (verde)	Alcalina (verde)	No Sacarolítica

Para especies de desarrollo lento puede requerirse una incubación de 3 días o más para detectar reacciones positivas. Esta prueba nos suministra información sobre la movilidad del microorganismo a estudio y la producción de gas: Aparecería opacidad en el medio y bolsas de gas.

PRUEBA DE LA CITOCROMO-OXIDASA

Interés:

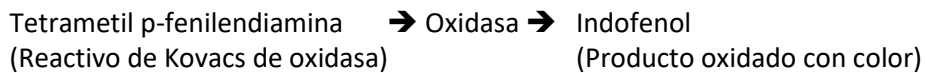
Diferenciar enterobacterias que dan la prueba negativa de los bacilos Gram (-) no fermentadores que la dan positiva y del Haemophilus.

Fundamento:

Los citocromos son hemoproteínas que contiene Hierro y actúan como el último eslabón de la cadena aerobia, transfiriendo electrones (Hidrógeno) al O₂ con formación de H₂O.

El sistema citocromo se encuentra en los microorganismos aerobios o anaerobios facultativos, de modo que la prueba de oxidasa es importante para identificar aquellos que carecen de ella, o bien, son anaerobios obligados.

Se basa en la siguiente reacción:



Técnica: Existen dos técnicas

→ **Técnica directa en placa:** se añaden 2 ó 3 gotas de reactivo de Kovacs de oxidasa (Tetrametil p-fenilendiamina) directamente sobre las colonias bacterianas aisladas que desarrollan en placa.

Observación: La aparición de color azul se interpreta como positiva.

→ **Técnica indirecta:** hay 2 formas:

a) Empleo de discos comerciales impregnados con reactivos: adicionamos una gota de agua destilada al disco y agregamos con el asa una colonia y observamos:

- Si hay cambio de color es positivo (azulado)
- Si no hay cambio de color es negativo.

b) Método de Kovacs sobre papel: Consiste en colocar un trozo de papel de filtro y agregamos 2 ó 3 gotas de reactivo de Kovacs de oxidada, extendemos una colonia con el asa y observamos a los 10 segundos:

- Color negro purpureo positivo
- Si no hay cambio de color es negativo.

PRUEBA DE NITRATOS Ó REDUCCIÓN DE NITRATOS

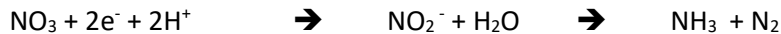
Interés:

Todas las enterobacterias, excepto ciertos biotipos de *Enterobacter* y de *Erwinia*, reducen los nitratos.

La prueba es útil para identificar especies de los géneros *Haemophilus*, *Neisseria* y *Branhamella*.

Fundamento:

Ciertos microorganismos son capaces de obtener oxígeno de los nitratos para formar nitritos y otros productos de reducción de acuerdo con la siguiente ecuación química.



La presencia de nitritos en el medio se detecta añadiendo alfa-Naftilamina y ácido sulfanílico, con la formación de un colorante rojo.

Preparación del medio y composición:

El más utilizado para esta prueba es el caldo de nitrato o el Agar-nitrato en pico de flauta. Se prepara siguiendo la técnica general, teniendo la siguiente composición:

· Extracto de carne	3 g
· Peptona	5 g
· Nitrato potásico	1 g
· Agar (libre de nitritos)	12 g
· Agua destilada csp	1 litro

Reactivos empleados:

Se utilizan:

- Reactivo A:	· alfa-Naftilamina	5 g
	· Ácido Acético al 30 % csp	1 litro
- Reactivo B:	· Ácido sulfanílico	8 g
	· Ácido Acético al 30 % csp	1 litro

Técnica:

- 1.- Inocular el medio con el asa cargada con la muestra de cultivo
- 2.- Incubar a 37°C durante 18-24h
- 3.- Finalizada la incubación, añadir al medio 1ml de reactivo A (alfa-Naftilamina) y 1ml de reactivo B (ácido sulfanílico)

Interpretación:

- Reacción (+): Desarrollo de color rojo a los 30 segundos indica presencia de nitritos reacción positiva.

- Reacción (-): Ausencia de color indica reacción negativa. Los nitratos no han sido reducidos a nitritos, o bien, han sido reducidos a productos distintos como NH_3 , N_2 (se llama desnitrificación).

Este último proceso llevaría a una lectura falsa negativa, por lo que es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de Zn a todas las reacciones negativas. Los iones de Zn reducen los nitratos a nitritos y la aparición de un color rojo tras adicionar el Zn indica la presencia de nitratos residuales y confirma la reacción negativa verdadera.

PRUEBA DE LAS DESCARBOXILASAS

Interés:

Diferenciar enterobacterias principalmente.

Fundamento:

Las descarboxilasas son un grupo de enzimas específicas que actúan sobre la porción carboxilo de los aa con formación de aminas de reacción alcalina. Esta descarboxilación da lugar a CO₂ como producto secundario.

Cada descarboxilasa es específica de un aa determinado. Los aa normalmente ensayados para identificación de enterobacterias son la lisina, ornitina y arginina, produciéndose las siguientes aminas respectivamente: cadaverina, putrescina y citrulina.

Medios de cultivo y composición:

Se emplea el caldo descarboxilasa de Moeller y la preparación se realiza siguiendo la técnica general, a lo que hay que añadir lo siguiente:

Se suspenden 10,5g de este medio en 1 litro de agua destilada. Se añade 10 g del aa a ensayar (concentración final 1%) de la forma L del aa. Si se trata de la forma D-L, añadir doble cantidad ya que sólo es activa la forma L.

Repartir en tubo de 3 ml aproximadamente y esterilizar según la técnica general.

Composición:	· Peptona	5g
	· Extracto de carne	5 g
	· Púrpura de Bromocresol	0,010 g
	· Rojo de Cresol	0,005 g
	· Glucosa	0,5 g
	· Piridoxal	0,005 g
	· Agua destilada csp	1 litro

Técnica:

- 1.- Se trabaja con 2 tubos: uno contiene el medio y el aa a estudio y el otro solamente contiene el medio, este último se utiliza como testigo o como control.
- 2.- Se inoculan ambos tubos con el microorganismo problema.
- 3.- Recubrir los 2 tubos con parafina líquida estéril (1cm)
- 4.- Incubar a 37°C efectuando lecturas cada 24h durante 4 días.

Interpretación

En un primer tiempo, los 2 tubos se vuelven amarillo debido a la fermentación de la glucosa del medio (el rojo cresol a pH ácido vira a amarillo). En un segundo tiempo, la descarboxilasa se ve favorecida por el pH ácido, actúa sobre el aa correspondiente originando aminas alcalinas, con lo que el medio retorna a su color original que es azul púrpura o púrpura rojizo.

PRUEBA DE LA GALACTOSIDASA (ONPG)

Interés: Poner de manifiesto aquellos microorganismos que posee la enzima galactosidasa.

Fundamento: Las bacterias fermentadoras de lactosa poseen **permeasa** (necesaria para la entrada de lactosa en la célula bacteriana) y **β -Galactosidasa** (desdobla la lactosa en glucosa y galactosa), dos enzimas requeridas para la producción de ácido en la prueba de fermentación de la lactosa.

Los microorganismos fermentadores de lactosa poseen ambas enzimas.

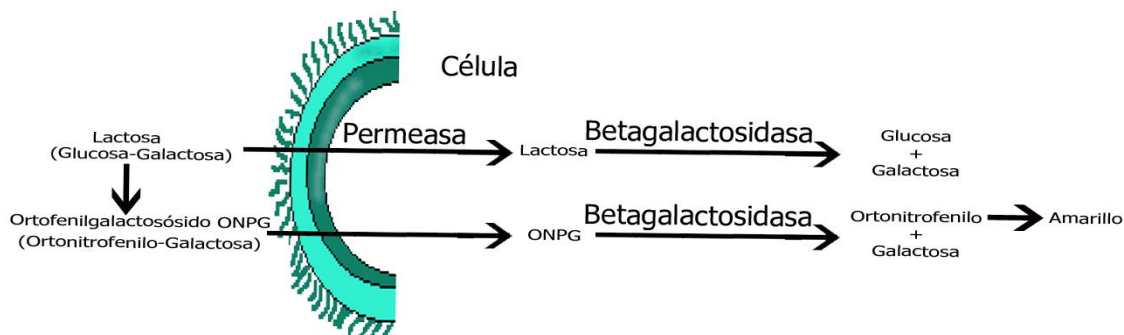
Los microorganismos no fermentadores carecen de éstas y no producen ácidos a partir de la lactosa.

Existen especies bacterianas que aparecen como no fermentadoras, ya que carecen de permeasa pero tienen β -galactosidasa y darían esta prueba positiva.

Los microorganismos fermentadores tardíos, debido a la lenta actividad de la permeasa, retrasan la producción de ácido a partir de lactosa. En estos casos, la prueba de la ONPG positiva puede suministrar una identificación rápida de los fermentadores tardíos.

El ortonitrofenilgalactosido (ONPG) es estructuralmente similar a la lactosa, salvo que la glucosa ha sido sustituida por el ortonitrofenil. La molécula de ONPG es más pequeña que la lactosa y no hace falta la permeasa para entrar en la célula. Por acción de la β -galactosidasa, el ONPG se hidroliza, desdoblándose en galactosa y ortonitrofenol.

El ONPG es un compuesto incoloro y el ortonitrofenol es amarillo, con lo cual se pone de manifiesto la hidrólisis permitida.



Medios y reactivos: Se emplean tabletas o discos de papel impregnados en ONPG y solución salina fisiológica.

Técnica:

- 1.- En un tubo de hemólisis, adicionar 1ml de solución salina fisiológica.
- 2.- Tomar con el asa la colonia a estudio y emulsionar en el tubo hasta obtener una buena suspensión bacteriana (bien disuelto).
- 3.- Añadir un disco de ONPG y llevar el tubo a la estufa a 37°C 18-24h.

Interpretación:

- Positiva: Color amarillo
- Negativo: No hay cambio

Normalmente, los resultados positivos se producen en menos de 1h. No se debe considerar la prueba como negativa hasta transcurrir las 24h de incubación.

PRUEBAS DE IMVIC (Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer, Citrato)

La palabra IMVIC, representa las siglas de las 4 de pruebas: I = Indol, M = Rojo de Metilo, VI = Voges Proskauer, C = Citratos.

PRUEBAS DE IMVIC 1.- PRUEBA DE INDOL

Interés:

Sirve para diferenciación de enterobacterias.

Fundamento:

Algunas bacterias son capaces de actuar sobre el triptófano desdoblándolo en Indol, ácido pirúvico y amoníaco (NH_3) gracias a que poseen la enzima triptofanasa.



El Indol existente en el medio, al adicionar a éste para-dimetil-aminobenzaldehído (reactivo de Kovacs), reacciona con el grupo aldehído formando un compuesto de color rojo llamado Indol-aldehído. Es necesario la existencia de clorhídrico en el medio para su formación. Se utiliza alcohol amílico para concentrar el color rojo en la superficie, apareciendo un anillo rojo.

Medios y reactivos:

Como medio se utiliza un medio rico en triptófano que es el caldo de triptófano (vamos a emplear agua de peptona).

Caldo de triptófano:	· Peptona o Triptona	2 g
	· NaCl	0,5 g
	· Agua destilada csp	100 ml

Como reactivo utilizamos el reactivo de Kovacs.

Reactivo de Kovacs:	· Alcohol amílico	150 ml
	· p-dimetil-aminobenzaldehído	10 g
	· HCl	50 ml

El medio se distribuye en tubo y se esteriliza según la técnica general.

Técnica:

- 1.- Inocular la colonia en el medio
- 2.- Incubar a 35-37°C durante 18-24h
- 3.- Después de la incubación, agregar 5 gotas de reactivo resbalando por las paredes del tubo.

Interpretación:

Prueba positiva: Anillo rojo en la superficie.

Prueba negativa: No se aprecia cambio de color.

PRUEBAS DE IMVIC 2. PRUEBA ROJO DE METILO

Interés: Identificar los microorganismos que actúan sobre la glucosa por vía de fermentación ácido-mixta.

Fundamento: Los microorganismos que actúan sobre la glucosa por la vía de fermentación ácido-mixta producen ácidos fuertes del tipo del ácido fórmico y láctico, disminuyendo considerablemente el pH del medio.

El indicador de pH rojo de metileno cambia de color (a pH=4,4 presenta color rojo)

Medios y reactivos: El medio es un caldo preparado según la fórmula de Clark y Lubs que se llama MR-VP. Se reparte en tubos y se esteriliza en autoclave.

Como reactivo se utiliza solución de rojo de metilo:	Rojo de Metilo	0,1 g
	Alcohol etílico	300 ml
	Agua destilada csp	500 ml

Técnica:

- 1.- Inocular en el medio de cultivo la colonia a estudio
- 2.- Incubar a 35-37°C durante 48-72h
- 3.- Lectura: añadir 5 gotas de reactivo

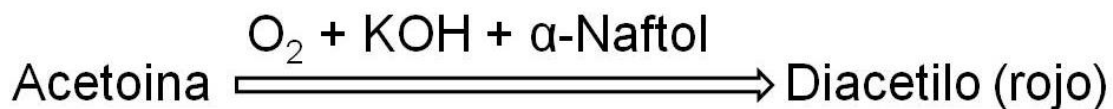
Interpretación

- Prueba positiva: Color rojo en todo el medio.
- Prueba negativa Si no aparece color rojo.

PRUEBAS DE IMVIC 3.- VOGES PROSKAUER

Interés: Es identificar los microorganismos que actúan sobre la glucosa por la víafermentativa, del Butilenglicol, originando como producto mayoritario acetoina, que es un compuesto de reacción neutra.

En presencia de O₂ atmosférico, de KOH y α-Naftol, la acetoina se oxida hasta Diacetilo, que es un compuesto de color rojo



Medios y reactivos: El medio es el MR-PV y como reactivo se utilizan:

- **Reactivo A:** solución de α-Naftol
- **Reactivo B:** solución de KOH

Técnica:

- 1.- Inocular en el tubo con el medio de cultivo la colonia a estudiar.
- 2.- Incubar a 35-37°C durante 24h.
- 3.- Lectura: transferir 1ml de caldo de cultivo a un tubo limpio y añadir unas gotas de α-Naftol y otras de KOH al 40% .

Es esencial adicionar los reactivos en ese orden.

- 4.- Agitar el tubo con cuidado y dejar reposar 15 min.

Interpretación:

- Prueba positiva: Color rojo a los 15minutos.
- Prueba negativa: No hay cambio o aparece color amarillo.

PRUEBAS DE IMVIC 4.- CITRATOS

Interés de la prueba: Algunos microorganismos pueden obtener energía por vía distinta a la de fermentación de los Hidratos de Carbono.

Con esta prueba se trata de investigar las bacterias capaces de utilizar el citrato como única fuente de Carbono.

Fundamento: La utilización de citrato por las bacterias lleva a la producción de NH_3 y, por tanto, a la alcalinización del medio. Se incluye como indicador de pH al azul de Bromotimol que presenta color amarillo a $\text{pH} < 6$ y color azul a $\text{pH} > 7,6$.

Medios de cultivo: Se emplea, generalmente, el medio de Simmons, muy rico en citratos. E incluye al azul de Bromotimol como indicador de pH.

El medio se dispensa en tubo en plano inclinado o pico de flauta.

Técnica:

- 1.- Inocular la superficie del plano inclinado realizando una sola estría.
- 2.- Incubar a $35-37^\circ\text{C}$ durante 24-48h.

Interpretación:

El desarrollo de un intenso color azul se interpreta como prueba positiva. También se considera positivo el crecimiento de los microorganismos a lo largo de la estría de inoculación (aún no se ha producido el viraje del indicador por no haber suficiente alcalinización del medio pero, si se prosigue la incubación 24h más, aparecerá el medio de color azul)

La prueba será negativa si no se observa ni color azul ni crecimiento.

PRUEBA DE FENIL-ALANINA-DESAMINASA (APP)

Interés de la prueba: Diferenciar los géneros Proteus y Providencia que poseen la enzima desaminasa de otros miembros de la familia enterobacterias que no la poseen.

Fundamento: Los microorganismos que tienen la enzima fenil-alanina-desaminasa actúan sobre la fenil-alanina produciendo la desaminación oxidativa de ésta y el producto resultante es el ácido fenil-pirúvico.

La prueba se basa en la detección de fenil-pirúvico en el medio.

Medios y reactivos: Se emplea Agar-fenil-alanina. La preparación del medio se realiza siguiendo la técnica general y se distribuye en tubo en plano inclinado.

Este medio no incluye ni extracto de carne ni hidrolizados de proteínas, ya que poseen cierta cantidad variable de fenil-alanina.

Como reactivo se emplea una solución acuosa de Cl_3Fe al 10%.

Técnica:

- 1.- Inocular el pico de flauta o plano inclinado con la colonia a estudio.
- 2.- Incubar a $34-37^\circ\text{C}$ durante 18-24h.
- 3.- Lectura: añadir 4 ó 5 gotas de Cl_3Fe al 10% directamente sobre la superficie del Agar, ir rotando el tubo para desprender las colonias de la superficie.

Interpretación:

- Prueba positiva: Aparición inmediata de color verde intenso.
- Prueba negativa: No se aprecia cambio.

PRUEBA DE MOVILIDAD

La movilidad es una característica importante en la identificación final de una especie. Las bacterias se mueven por flagelos.

Existen tinciones flagelares para su detección pero, normalmente, se emplean poco.

Los métodos más utilizados son los siguientes: - Método directo entre porta y cubre
- Método de la gota pendiente

Estos dos métodos se emplean para bacterias que no desarrollan bien en Agar.

Se prefiere otro método que utiliza tubos con Agar semisólido para esta prueba. Las enterobacterias se desarrollan bien en estos medios.

Los medios para la prueba contienen concentraciones de Agar de 0,4% o menos. Al aumentar la concentración, el medio se hace más firme y reduce las posibilidades de diseminación de los microorganismos.

Medios utilizados:

- Medio SIM (Sulfuro, Indol, Movilidad)
- Medio MIO (Movilidad, Indol, Ornitina)

Se debe interpretar primero la prueba de movilidad ya que, al adicionar el reactivo de Indol, se pueden enmascarar los resultados.

Estos medios poseen una ligera turbidez que puede dificultar la lectura de movilidad en especies que se desarrollan lentamente en estos medios.

Los medios se preparan según la técnica general y se dispensan en tubo.

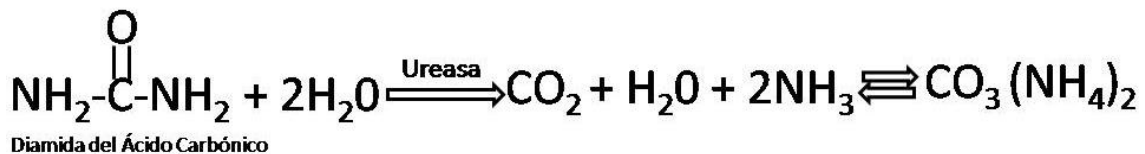
Técnica: Inocular la colonia a estudio con hilo de platino hasta el fondo del medio e incubar a 35-37°C durante 24h.

Interpretación: Se procede al examen macroscópico del medio. La aparición de una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación se interpreta como movilidad positiva.

PRUEBA DE LA UREASA

Interés: Es identificar los microorganismos capaces de desdoblar la urea de los que no lo hacen. El Proteus y la Klebsiella son urea (+) y Providencia y E.Coli son urea (-).

Fundamento: Algunos microorganismos poseen la enzima ureasa capaz de desdoblar la urea (Diamida de Ácido Carbónico) de acuerdo con la siguiente reacción:



El amoniaco formado reacciona en solución para formar $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ (carbonato amónico), originándose una alcalinización del medio y, por tanto, un aumento del pH, virando el indicador de color.

Medios: Se emplea el caldo de Stuart o el Agar-urea de Christensen. Ambos medios poseen urea en su composición. La preparación requiere esterilización por filtración, ya que si sometemos el medio a la acción del calor, la urea se descompone rápidamente.

Técnica: Sembrar en la pendiente del medio con abundante inóculo e incubar a 35-37°C durante 18-24h. Hay microorganismos que dan la reacción positiva en pocas horas, sin embargo, otros necesitan varios días. De aquí que la prueba no se dé como negativa hasta pasado 6 días de incubación.

Interpretación: Pendiente del medio color rojo indica hidrólisis de la urea y alcalinización del medio y, por lo tanto, prueba es positiva.

Si no hay cambio de color, indica que no hay ni hidrólisis de la urea, ni alcalinización del medio y, por lo tanto, la prueba es negativa.

Técnica de la Ureasa con discos de papel:

- 1.- 0,5-1ml de agua de peptona
- 2.- Emulsionar una colonia
- 3.- Colocar un disco de urea
- 4.- Incubar a 37°C durante 18-24h.

La aparición de color rojo indica prueba positiva.

Si no hay cambio de color la prueba es negativa.