

## *Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias*

### **Prueba de la Catalasa**

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba se utiliza para comprobar la presencia de la enzima **catalasa** que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen el **citocromo oxidasa**. La principal excepción son los estreptococos (*Streptococcus*).

Originariamente, esta prueba era utilizada para diferenciar entre los siguientes géneros:

*Streptococcus* (catalasa -) de *Micrococcus* (catalasa +) y/o *Staphylococcus* (catalasa +). *Bacillus* (+) de *Clostridium* (-). *Lysteria monocytogenes* (+) y/o *Corynebacterium* (+, con las excepciones de las especies *C. pyogenes* y *C. haemolyticum*, ambas -) de *Erysipelothrix* (-)

### **Material**

Agua oxigenada al 30%, cultivo bacteriano y portaobjetos o tubo de ensayo.

### **Procedimiento**

Normalmente hay dos tipos de pruebas:

#### **Método del portaobjetos:**

Es una prueba de rutina de la catalasa a temperatura ambiente.

#### **Procedimiento**

En un portaobjetos se depositan una o dos gotas de agua oxigenada al 30% y se pone en contacto con ella una colonia de los microorganismos a estudiar. La muestra se recoge con el asa de siembra y se toma preferentemente el centro de una colonia pura de 18-24 horas.

#### **Revelado**

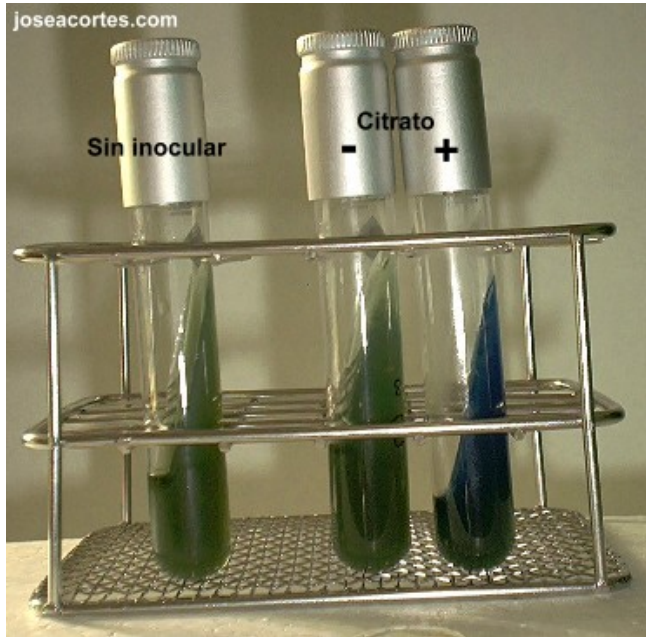
Observar la formación inmediata de una efervescencia rápida con desprendimiento de burbujas (resultado positivo). Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante. Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.

**Precauciones:** Si se utilizan para esta prueba cultivos procedentes de agar sangre, se debe tener la precaución de no retirar algo de agar con el asa al retirar la colonia ya que los eritrocitos del medio contienen catalasa y su presencia dará un falso resultado positivo

#### **Método del tubo de ensayo**

Agregar 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% directamente a un cultivo de agar densamente inoculado. Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

## Prueba del Citrato



Esta prueba sirve para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Entre las enterobacterias estas características se dan en los siguientes géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Salmonella*. Sin embargo, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* son incapaces de crecer con esos nutrientes.

Se cultiva el microorganismo en **agar citrato de Simmons**. Este me-

dio contiene citrato de sodio y fosfato de amonio como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente, y azul de bromotimol, como indicador de pH. Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones amonio lo que, junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte alcalinización del medio que será aparente por un cambio de color del indicador de pH, de verde a azul.

### Material

Un tubo con medio agar citrato Simmons y un cultivo bacteriano

### Procedimiento

Sembrar con un asa de siembra en la superficie inclinada del medio e incubar a 37 °C durante 24-48 horas.

### Revelado

Las bacterias capaces de usar el citrato provocarán el cambio de color del medio de verde a azul intenso, por viraje del indicador de pH, azul de bromotimol, a la vez que se observa crecimiento en la superficie.

## Prueba de la Fenilalanina Desaminasa



Esta prueba determina la capacidad de un organismo para desaminar el aminoácido fenilalanina en ácido fenilpirúvico por la actividad de la enzima **fenilalanina desaminasa**, con la consiguiente acidez resultante. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies del género *Proteus* y del grupo *Providencia* por lo que se usa para separar ambos géneros de otras enterobacterias. El ácido fenilpirúvico puede detectarse por la adición de un reactivo (cloruro férrico al 10%)

Se cultiva el microorganismo en **agar fenilalanina** sembrando la superficie del slant con abundante inóculo e incubando durante 24 horas a 37 °C. Seguidamente se añade 4-5 gotas de la solución de cloruro férrico al 10% de manera que inunde todo el medio inclinado. La presencia de ácido fenilpirúvico (prueba positiva) se manifiesta por la aparición de un color característico verde oscuro o verde-azulado.

do el medio inclinado. La presencia de ácido fenilpirúvico (prueba positiva) se manifiesta por la aparición de un color característico verde oscuro o verde-azulado.

## Prueba del Indol



El indol es uno de los productos de degradación del aminoácido triptófano. La presencia de la enzima **triptofanasa** en la bacteria provoca la hidrólisis del aminoácido y su desaminación, produciendo indol, ácido pirúvico y amoníaco.

### Material

Medio de cultivo con peptona, cultivo bacteriano y reactivo de Kovacs.

### Procedimiento

Inocular el caldo con el microorganismo e incubar a 37 °C durante 24-48 horas. Transcurrido ese tiempo añadir 4 o 5 gotas de reactivo Kovacs, resbalando por la pared del tubo sin agitar.

Para la realización de esta prueba la bacteria se cultiva durante 24-48 horas en un **caldo de triptona** con NaCl al 0,5% (la triptona presenta abundante triptófano). Para la posterior detección del indol se usa el **reactivo de Kovacs** que se puede preparar con los siguientes ingredientes

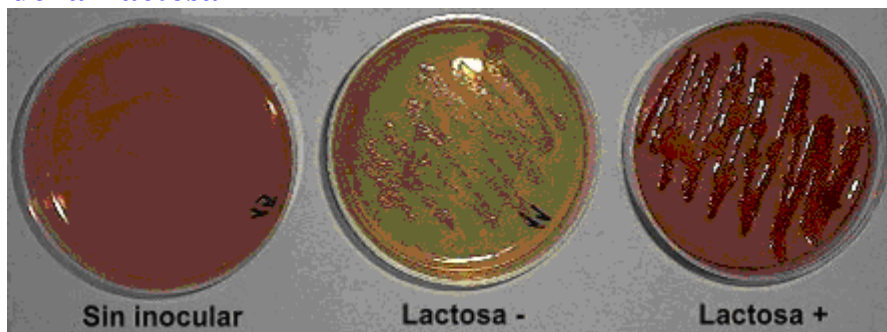
**Alcohol amílico** o **isoamílico** (puede sustituirse por **alcohol butílico**).....150 ml  
**p-dimetilaminobenzaldehído**.....10 g  
**HCl** concentrdo.....50 ml

Se disuelve primero el aldehído en el alcohol y después se agrega lentamente a esta mezcla el ácido. Para el control de calidad del reactivo se pueden utilizar cultivos conocidos. Las más convenientes son *Escherichia coli* (indol +) y todas las especies de *Klebsiella* (indol -).

### Revelado

Si la bacteria posee la enzima triptofanasa, al añadir al medio las gotas del reactivo de Kovacs, se producirá un anillo de color rojo cereza en la superficie del caldo y la prueba será considerada positiva. Si esto ocurre después de 24 horas, la prueba se considera completa, pero si es negativo deberá incubarse otras 24 horas y repetirse la prueba. Por ello es conveniente hacer siempre la prueba no en el tubo incubado sino en una porción de unos 2 ml que se retira de él asépticamente

### Prueba de la Lactosa



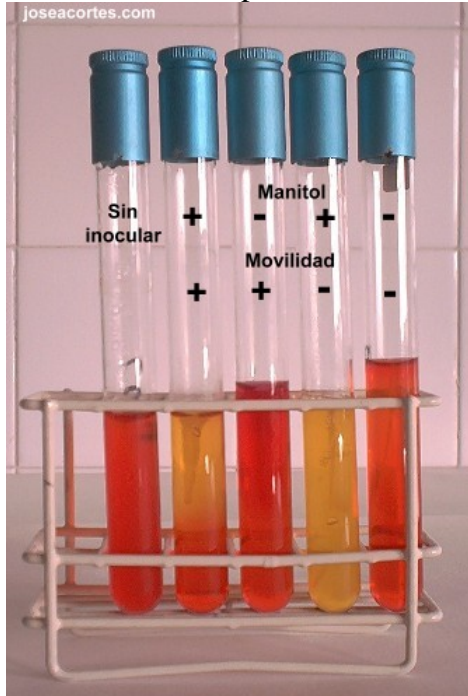
Esta prueba se usa para diferenciar entre las enterobacterias en general y el grupo de los coliformes. Se trata por tanto de una prueba de gran importancia debido a que los coliformes se utilizan como organismos indicadores de contaminación fecal en análisis, sobre todo, de aguas. En bacteriología se define el grupo de organismos coliformes como los "**bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no formadores de esporas y que fermentan la lactosa con formación de gas a 37 °C en 48 horas**". No se trata de un grupo taxonómico e incluye una gran variedad de bacterias, la mayoría de ellas de origen intestinal.

Una manera sencilla de realizar la prueba de la fermentación de la lactosa en enterobacterias es sembrar el microorganismo en **agar McConkey**, ya que este medio, además de selectivo frente a bacterias no entéricas, es diferencial ya que contiene lactosa y un indicador de pH (rojo neutro).

En agar McConkey las bacterias Gram positivas ven inhibido su crecimiento debido a la presencia de sales biliares y cristal violeta y sólo crecerán las enterobacterias, pero entre ellas las que fermenten la lactosa (coliformes) liberarán productos ácidos que producirán un cambio de pH que se detectará gracias al rojo neutro. Las colonias lactosa (+) aparecerán de color rojo o violeta contrastando con la coloración amarillenta de las colonias lactosa (-).

## Manitol-Movilidad-Nitratos

Se incluyen en este apartado 3 pruebas bioquímicas debido a que se pueden realizar cultivando el microorganismo en un único medio, el **Manitol movilidad**, que se prepara en tubo con agar recto y se siembra en picadura, incubándose a 37 °C durante 24 horas. También existe la posibilidad de hacer las pruebas en otros medios y por separado



### 1. Prueba del Manitol

Sirve para detectar si los gérmenes son capaces de fermentar el manitol liberando productos ácidos que serán detectados gracias al indicador rojo de fenol que cambiará a color amarillo. Para esta prueba el **medio manitol movilidad** incluye 7,5 g/l de D-Manita. Bacterias manitol (-) son, dentro de las enterobacterias, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* y *Shigella dysenteriae*. Entre las bacterias de importancia clínica, la prueba del manitol sirve para diferenciar *Staphylococcus aureus* (+) de *Staphylococcus epidermidis* (-).

### 2. Prueba de la Movilidad

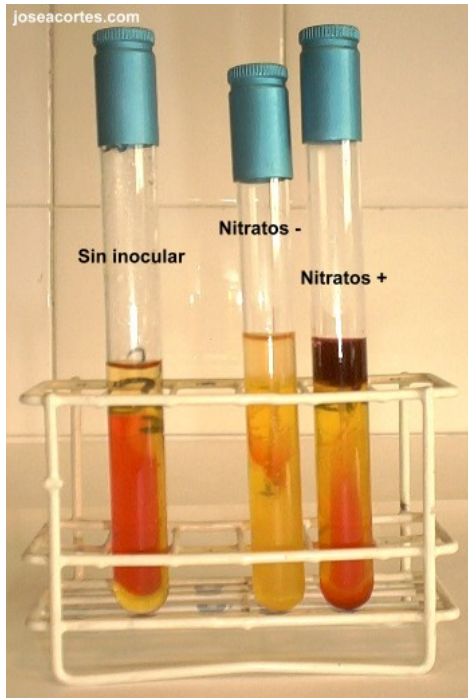
Sirve para determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos aunque existen algunas formas de cocos móviles.

El medio manitol movilidad permite la realización de esta prueba gracias a ser semisólido ya que presenta solamente 3,5 g/l de agar. En estas condiciones, las bacterias móviles producirán un enturbiamiento homogéneo del medio debido a la distribución aleatoria de los microorganismos. Por el contrario, las bacterias inmóviles permanecerán en la misma línea de la picadura en que se sembraron.

Entre las enterobacterias, la movilidad nos permite diferenciar el género *Klebsiella* (-) de las restantes que suelen ser movilidad (+).

Dentro del género *Bacillus*, nos permite diferenciar *B. anthracis* (-) de otras especies generalmente (+).





### 3. Prueba de la reducción de nitratos

Sirve para determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos. Para ello, el medio manitol movilidad incorpora 1 g/l de nitrato potásico y para revelar la presencia de nitritos después de su incubación se añaden los reactivos A y B de Griess-Ilosvay en cantidades iguales (1ml aprox.). Un cambio de color (rojo) dentro de los 30 seg indica prueba completa con resultado positivo. Si no cambia de color, se agrega directamente al tubo una pizca (unos 20 mg) de polvo de cinc purísimo, totalmente exento de nitratos o nitritos, y se observa el cambio de color durante otros 30 seg, al cabo de los cuales se realiza la interpretación final.

Las enterobacterias son generalmente nitratos (+). Esta prueba se utiliza principalmente para diferenciar entre sí determinadas bacterias de los géneros *Haemophilus* y *Neisseria*.

### Prueba de la Oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas **oxidasa**s. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema **citocromo oxidasa**. Los citocromos son enzimas que forman parte de la cadena de transporte de electrones en la respiración aeróbica, transfiriendo electrones al oxígeno, con la formación de agua. Por lo general, el sistema **citocromo oxidasa** sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica.

La prueba de la oxidasa se usa sobre todo para: Identificar todas las especies de *Neisseria* (+), y diferenciar *Pseudomonas* de los miembros oxidasa negativos de las enterobacterias.

El reactivo de la oxidasa más recomendado es la solución acuosa al 1% de **diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina** (**reactivo de Kovacs**). Es menos tóxico y mucho más sensible que el correspondiente compuesto **dimetilo** (**reactivo de Gordon y McLeod**), pero es más caro. Este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso.

#### Procedimientos:

##### Método en placa directa.

Agregar directamente 2-3 gotas de reactivo a algunas colonias. No inundar toda la placa y no invertirla. Observar los cambios de color. Con el reactivo de Kovacs la reacción se produce en unos 10-15 segundos, mientras que con el de Gordon y McLeod es dentro de los 10-30 minutos.

##### Método indirecto sobre papel

Colocar un trozo de papel de filtro de 3x3cm aproximadamente en una placa de Petri. Agregar 2-3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro del papel. Extender con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado. La reacción de color positiva se produce a los 5-10 segundos.

## Revelado

Cambio de color a púrpura y negro en 10-20 segundos, como consecuencia de que el reactivo se oxida en presencia del citocromo oxidasa formándose azul de Wuster. En caso negativo no hay cambio de color.

## Prueba del Rojo de Metilo/y Voges-Proskauer

Estas dos pruebas forman parte del **IMViC** de las colimetrías y permiten la diferenciación dentro de las enterobacterias del grupo *coli* y *aerógenes*. Las enterobacterias son anaerobios facultativos que utilizarán la glucosa en dos fases: primero la metabolizarán aeróbicamente, consumiendo rápidamente el oxígeno del medio, para, en segundo lugar, continuar metabolizándola por vía anaerobia (**fermentación**). Ésta puede ser de dos tipos:

**Fermentación ácido mixta:** La realizan las bacterias del grupo de *E. coli* y los productos finales son ácidos orgánicos (ácidos fórmico, acético, láctico y succínico) que provocan un fuerte descenso del pH inicial del medio. Puede detectarse por el viraje del indicador de rojo de metilo que permanece amarillo por encima de pH 5,1 y rojo por debajo de 4,4.

**Fermentación butilén glicólica:** La realizan las bacterias del grupo *Klebsiella-Enterobacter* (antiguo aerógenes). Los productos finales son compuestos neutros como el butanodiol y el etanol, produciéndose acetoina como intermediario que podrá ser detectada añadiendo al medio KOH (reactivo A de Voges-Proskauer) y  $\alpha$ -naftol (reactivo B de Voges-Proskauer) que reaccionarán con este compuesto produciendo un color rojo característico.

La prueba consiste en comprobar si el microorganismo en estudio fermenta la glucosa con producción de ácidos o vía ácido mixta.

Para la realización de estas dos pruebas se cultiva el microorganismo en caldo RM-VP (**medio de Clark y Lubs**) y se incuba a 37 ° C durante un periodo 24-48 horas. Pasado este tiempo, se separa el cultivo en dos porciones de unos 2 a 5 ml que servirán para cada uno de los dos ensayos:

**Rojo de Metilo:** A uno de los tubos se le añade unas gotas (4-5) de solución indicadora de Rojo de Metilo. Se agita ligeramente para homogeneizar y se observa la coloración. Se considera positiva si vira al rojo y negativa si permanece amarillo.

**Voges-Proskauer:** A la otra porción de cultivo se le añade:

0,6 ml del Reactivo A de Voges-Proskauer ( $\alpha$ -naftol al 5% en alcohol etílico absoluto). El medio adquiere un aspecto lechoso.

0,2 ml del Reactivo B de Voges-Proskauer (KOH 40%). Desaparece el aspecto lechoso y se agita fuertemente.

Si la prueba es positiva, transcurridos 10 minutos desde la adición de los reactivos, aparecerá un color rosado-violáceo, más o menos intenso, que se inicia en la parte superior del tubo. El cambio de color nos indica que la acetoina se ha oxidado pasando a diacetilo. Si la prueba es negativa no aparece coloración alguna.

## Prueba de la Ureasa



Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando una molécula de dióxido de carbono y dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima **ureasa**. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado.

Se cultiva el microorganismo en slant en **agar urea de Christensen**. Este medio se complementa después del autoclavado con 50 ml/l de urea. Ésta será degradada por aquellos microorganismos capaces de producir la enzima **ureasa**. Esta degradación produce

amoníaco que hará variar el color del indicador de amarillo a rojo, poniéndose así de manifiesto la actividad **ureasa**.

### Procedimiento

Inocular el medio de cultivo mediante estría en la superficie inclinada e incubara 37 °C durante 24 horas.

### Revelado

Para revelar el resultado de esta prueba es importante tener en cuenta el tiempo de incubación ya que especies de *Proteus* vuelven alcalino el medio poco después de la inoculación y sus resultados deben ser leídos en las primeras 2-6 horas, mientras que *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae* tienen actividad ureasa dentro de las 24-48 horas de incubación.

Las bacterias que hidrolizan la urea hacen que el medio de cultivo tome color fucsia, debido a la alcalinización del mismo por producción de amonio, que manifiesta por un viraje del indicador de pH (rojo de fenol).

## Prueba movilidad ornitina

Se usa para determinar la movilidad bacteriana. Además, permite determinar la capacidad microbiana de descarboxilar al aminoácido ornitina.

### Procedimiento

Se toma una colonia con un asa en hilo y se siembra el medio preparado en tubo recto. Se incuba a 37 °C durante 18-24 horas.

### Revelado

Las bacterias móviles darán lugar a una difusión lateral de la estría por picadura central de la siembra.

Las enterobacterias que fermentan la glucosa producirán una acidificación del medio lo que originará un cambio de color de violáceo a amarillo. En estos casos la ornitina descarboxilasa (ODC) es negativa. Si el fondo del tubo queda sin cambio de color (queda violáceo), se tratará de ODC positivo, habiendo utilizado la bacteria la ornitina y alcalinizando el medio.