

Características Fisiológicas Bacterianas

Esther Z. Vega, Ph.D.

Términos Claves

➤ Isolation (culture)

- Agar plate/
colonies
- Liquid media test
tube - bulk

➤ Identification & taxonomy

- Family
- Genus
- Species
- Type
- Strain

Biochemical (physiological) tests

Molecular tests

DNA-DNA homology

16S rRNA sequencing

Chemical profiling

Non culture based detection

Polymerase chain reaction- (PCR)

Agglutination (antigen detection)

Stain

Serology (antibody detection)

Clasificación

- ✓ Familia: grupo de géneros relacionados.
 - ✓ Género: grupo de especies relacionadas.
 - ✓ Especies: grupo de cepas relacionadas.
 - ✓ Tipo: grupo de cepas dentro de una especie (e.g. biotipos, serotipos).
 - ✓ Cepa: un organismo aislado dentro de una especie en particular.
-

Pasos para la identificación de bacterias

Paso 1. Muestras son estriadas en placas y colonias son aisladas luego de la incubación. Se observan las colonias por tamaño, textura, color y si son crecidas en agar sangre por patrones de hemólisis. Otra característica importante es el requerimiento de oxígeno

Paso 2. Las colonias son teñidas por tinción Gram y se observan las células individuales por el microscopio.

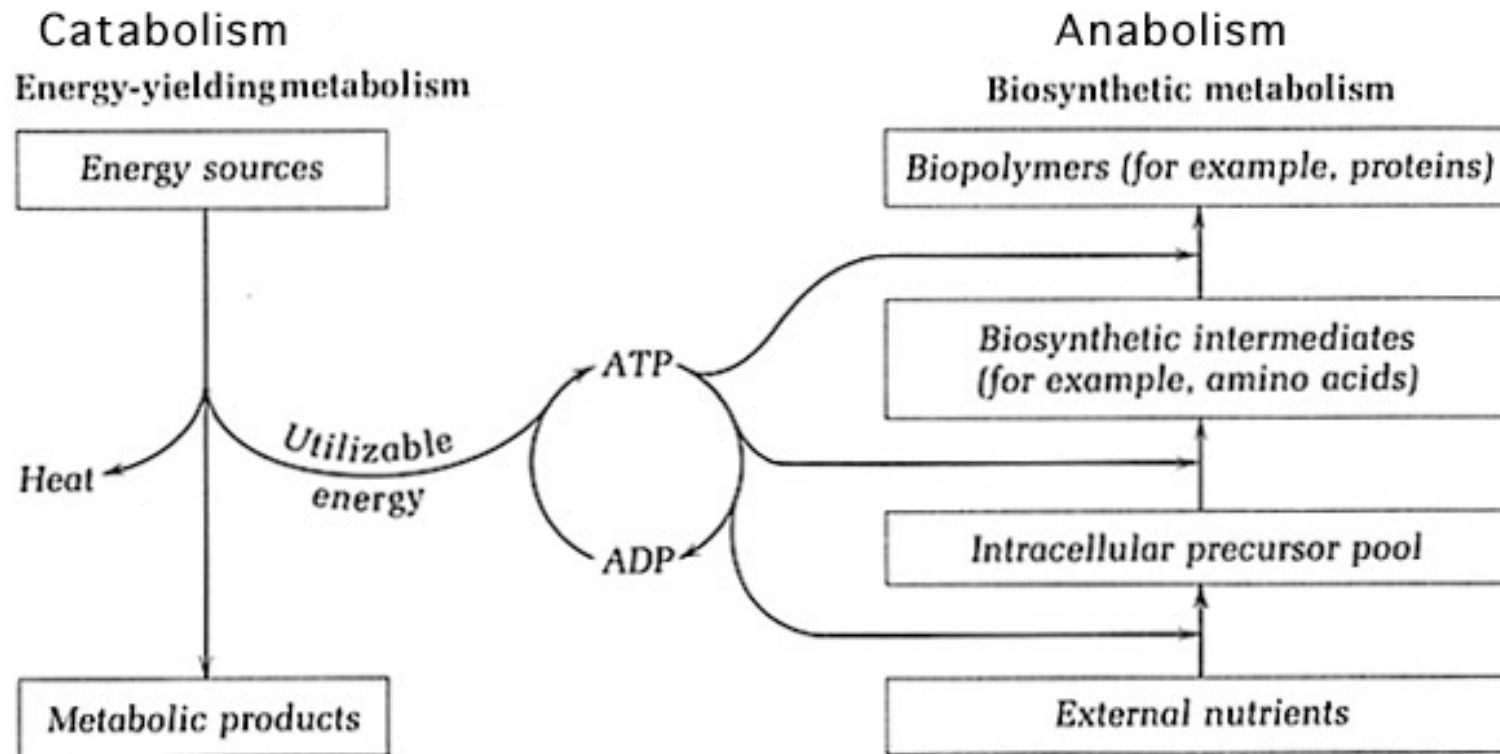
¿Qué información obtenemos?

- Relación entre característica fisiológica y función celular
 - Relación entre las actividades que llevan a cabo en su ambiente natural
 - Relación con los trayectos metabólicos microbianos
-

Producción de energía

Fermentación de Azúcares

Metabolismo

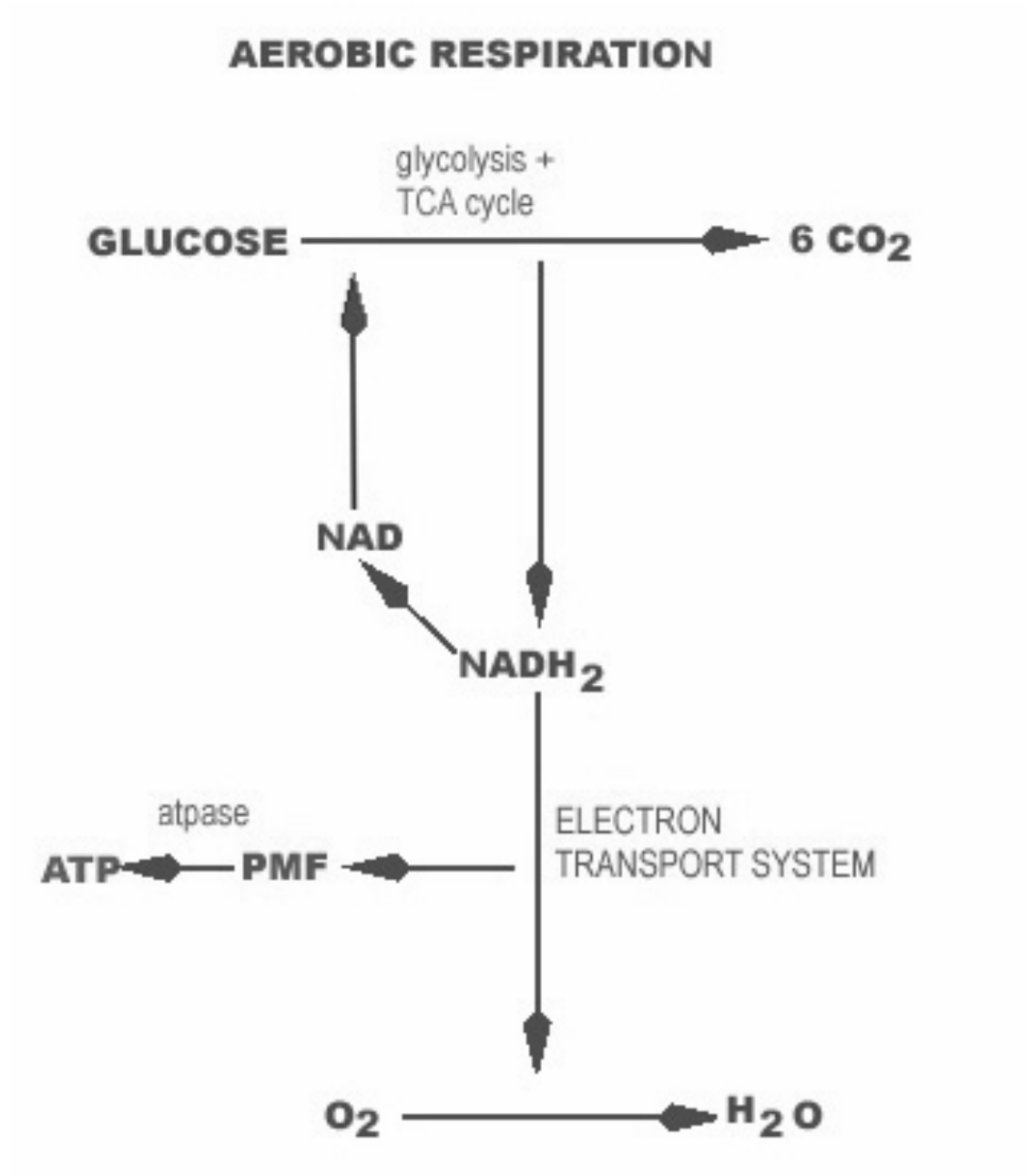


Tipos de metabolismo heterotrófico

- Utilización de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía
 - Catabolismo-oxidación de moléculas orgánicas para producir energía
 - Fermentación
 - Respiración
 - Anabolismo- utilización de energía para sintetizar material celular
-

Bacterias oxidativas

Molécula de azúcar se rompe completamente

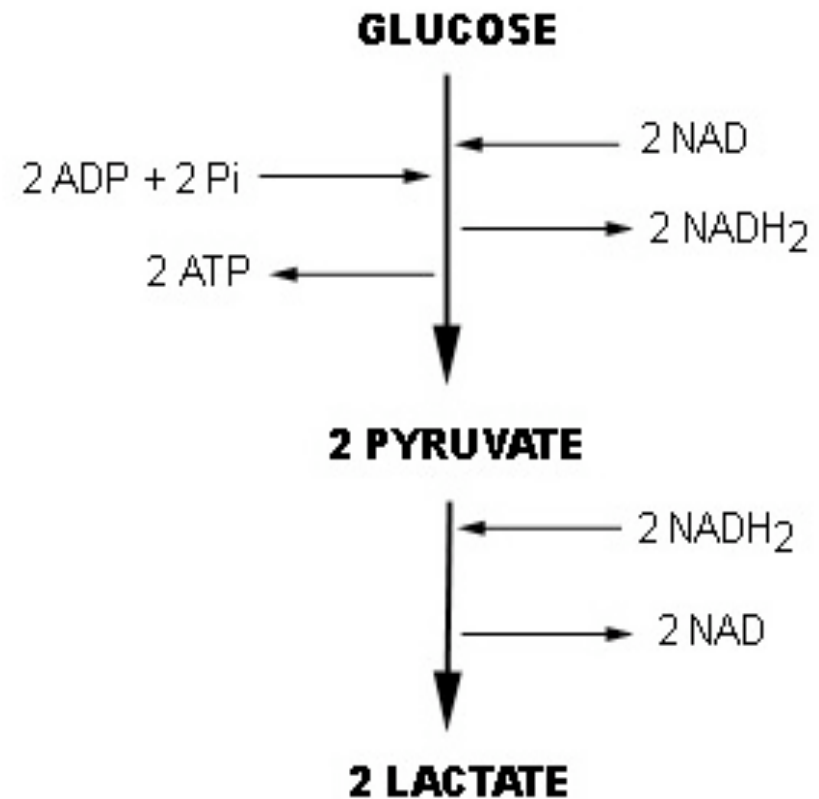
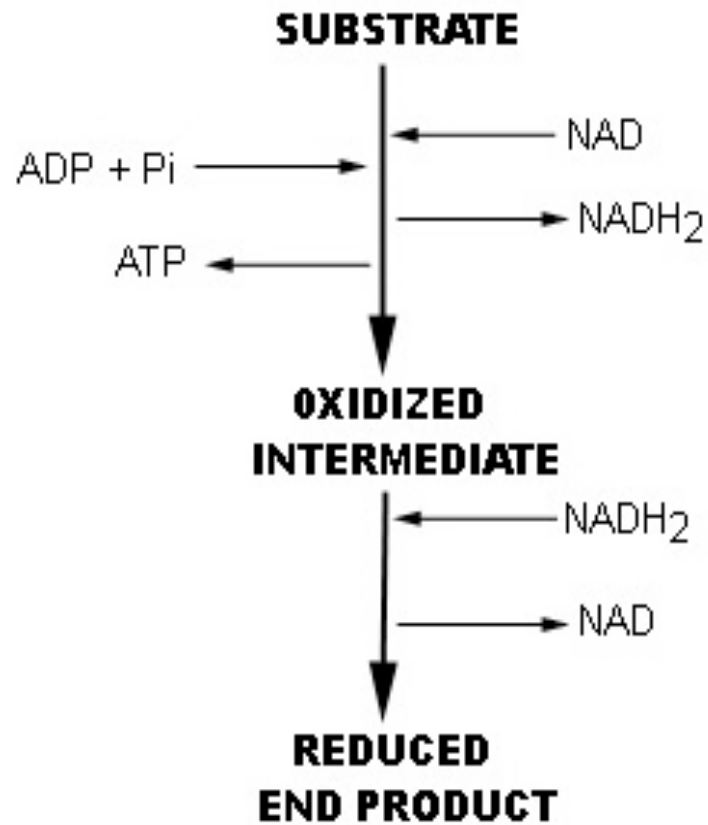


Fermentación

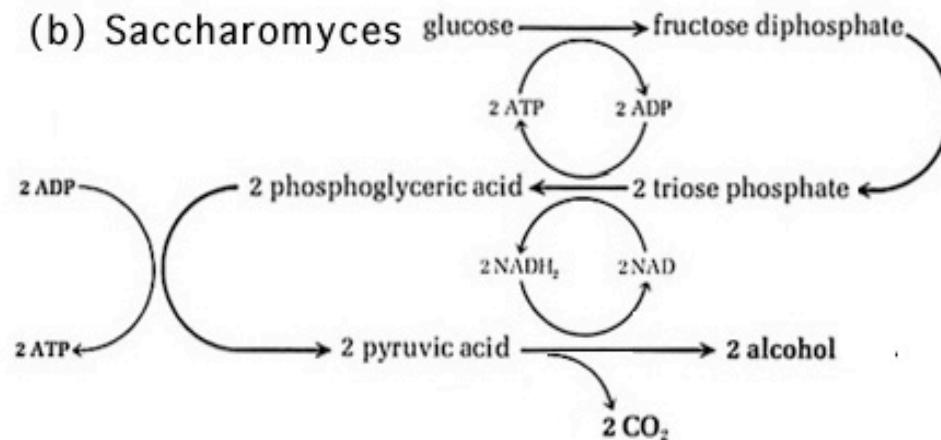
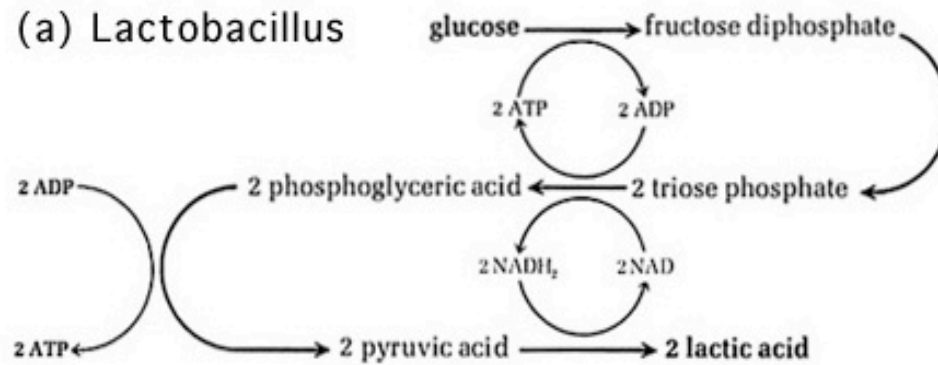
- Oxidación parcial de un compuesto orgánico utilizando intermediarios orgánicos como donantes y aceptadores de electrones

Todo el ATP es producido por fosforilación a nivel de sustrato

Modelos de fermentación



Fermentación láctica y alcohólica



Otras fermentaciones

- Homoláctica
 - *Lactobacillus*, *Lactococcus* y la mayoría de los *Streptococcus*
 - Mixta
 - Mayormente *Enterobacteriaceae*
 - Producción de ácido láctico, acético, fórmico, succinato y etanol
 - Butanediol
 - *Klebsiella*, *Enterobacter*
 - Ácido butírico
 - Clostridia
 - ácido acético, CO₂ y H₂
 - Butanol-acetona
 - *Clostridium acetobutylicum*
 - Ácido propiónico
 - *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*
-

Producción de alimentos fermentados

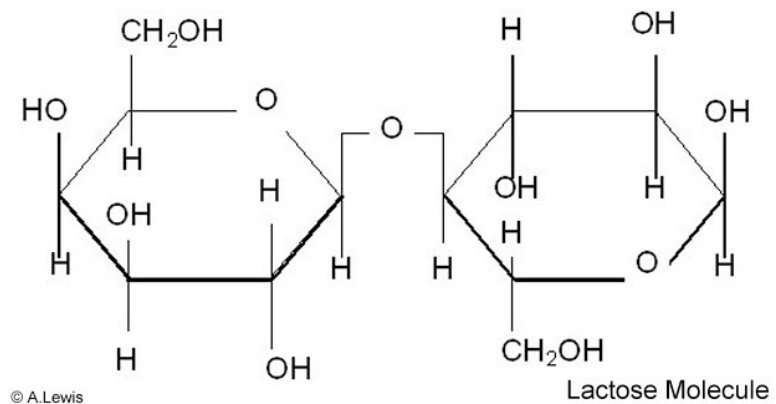


Azúcares utilizadas en las pruebas de fermentación

- Glucosa
 - Lactosa
 - Manitol
 - Inositol
 - Sorbitol
 - Ramnosa
 - Melibiosa
 - Amigdalina
 - Adonitol
 - Arabinosa
 - Dulcitol
-

Fermentación de lactosa

- Importante en la identificación de bacterias entéricas como las **Enterobacteriaceae**
- Fermentadoras de lactosa: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*
- No fermentadoras: *Salmonella*, *Proteus* y *Shigella*



Enterobacterias

- Aeróbicos y facultativos anaeróbicos
 - Gram negativo
 - No formadores de esporas
 - Forma de bacilo
 - Fermentan lactosa, con producción de ácido y gas dentro de 48 hr a 35°C
-

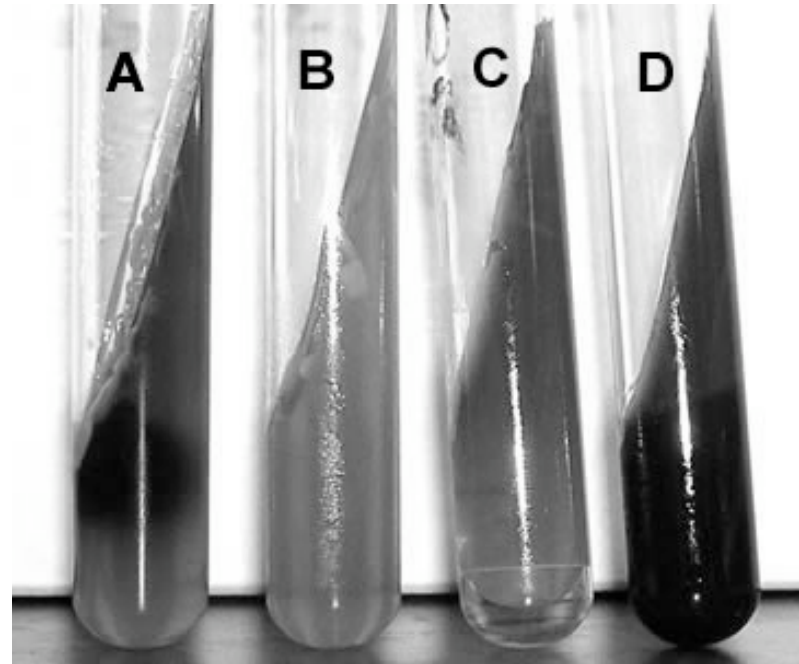
Pruebas de fermentación



- Producción de ácidos- rojo fenol como indicador de pH
 - Tubo Durham- producción de gas
 - Pruebas de fermentación en: glucosa, lactosa y manitol
-

Triple Sugar Iron

- Tres azúcares: glucosa, lactosa y sucrosa
- Rojo fenol como indicador de pH
- Contiene hierro-permite detectar la producción de H_2S a partir de amino ácidos
- Puede detectarse producción de gas

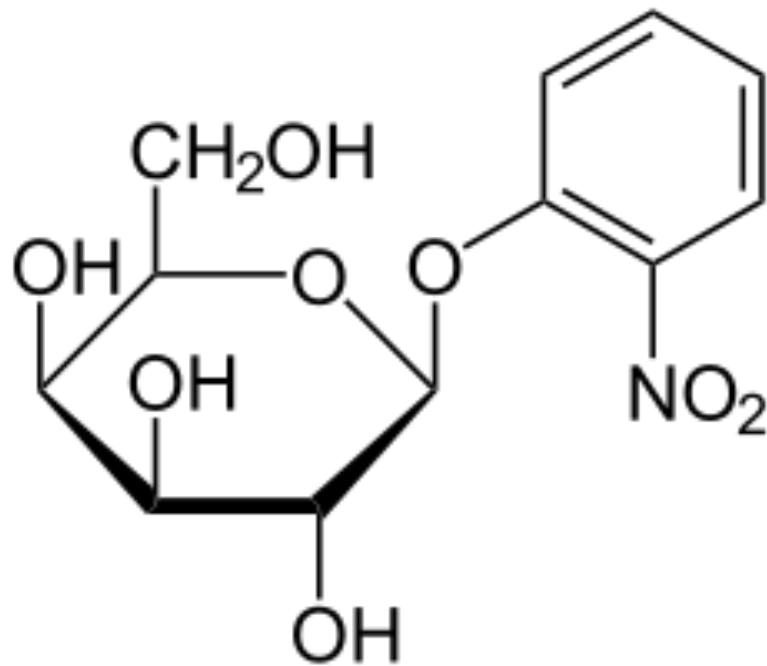


A. Salmonella sp.
B. Escherichia coli
C. Unknown
D. Proteus mirabilis

Pruebas de hidrólisis

- Detección de actividades enzimáticas bacterianas
 - ONPG- sustrato artificial análogo de la lactosa
 - Urea- compuesto nitrogenado sencillo
 - Caseína- proteína principal de la leche
 - Gelatina- proteína derivada del colágeno animal
 - Almidón- polisacárido de origen vegetal
 - Lípidos o grasas
-

Hidrólisis de ONPG

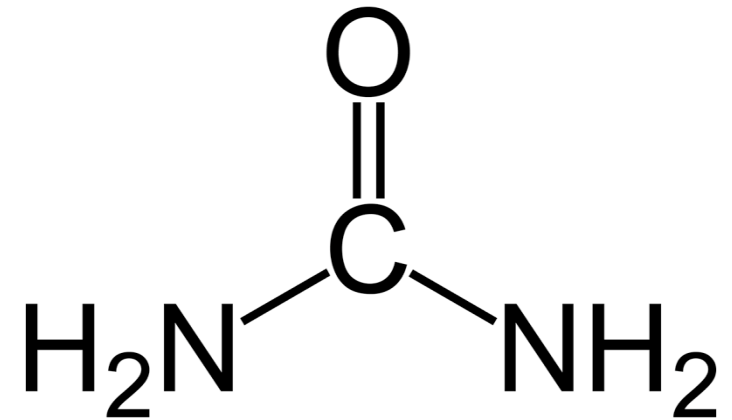


- Producción de galactosa y o-nitrofenol
- Amarillo en condiciones alcalinas



Hidrólisis de urea

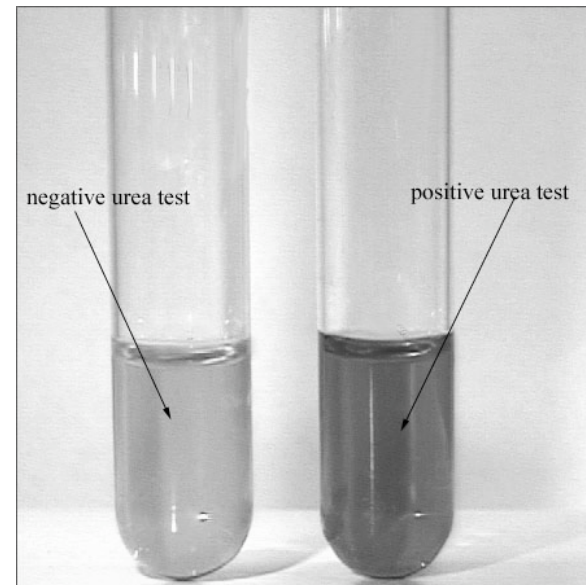
- Ureasa ataca enlace entre carbono y nitrógeno prociendo CO₂, agua y amoníaco
- Rojo fenol



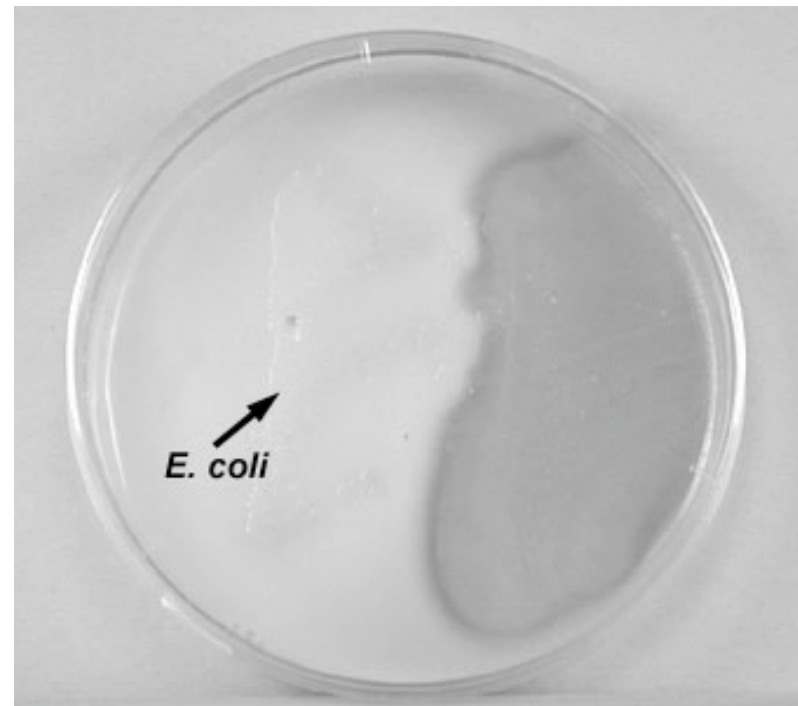
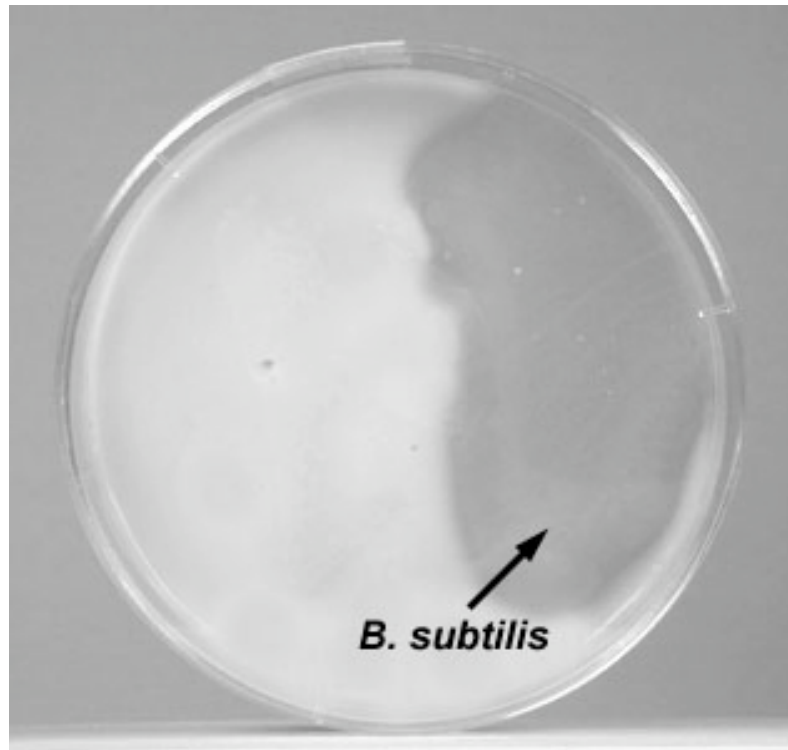
Urea

Hidrólisis de urea

- Prueba útil para distinguir *Proteus* de otras bacterias entéricas Gram-



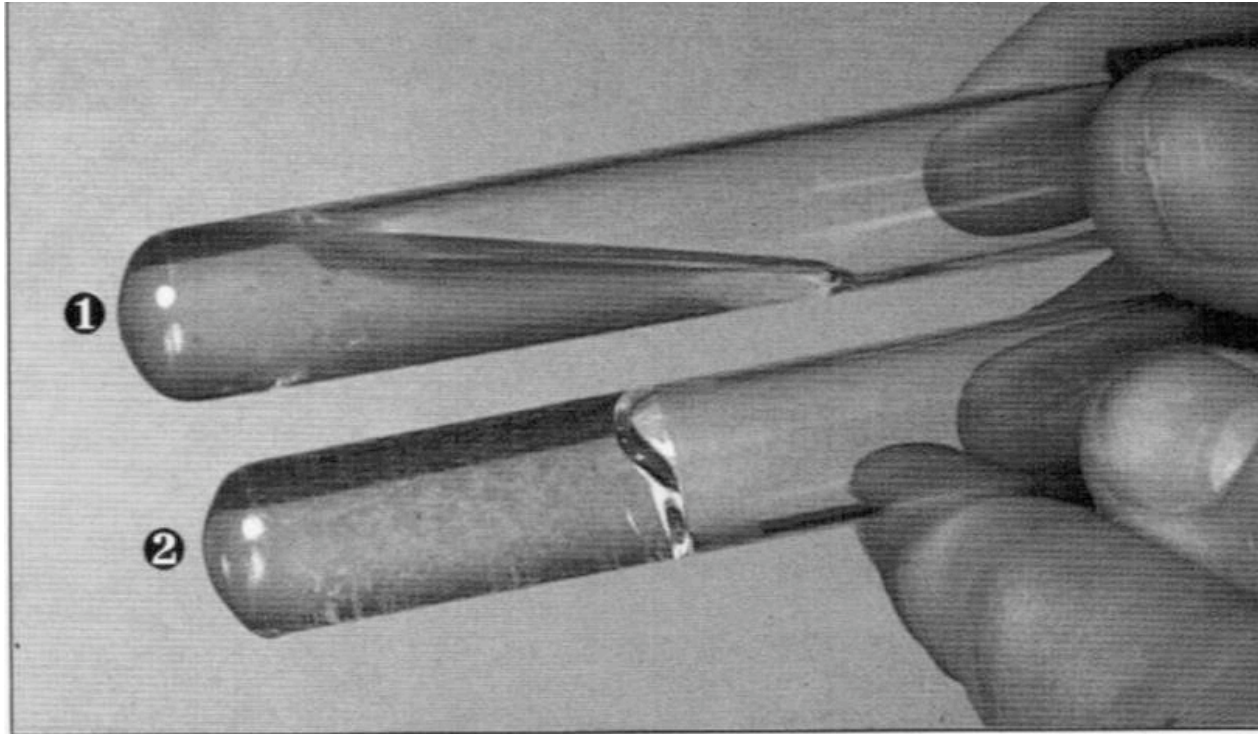
Hidrólisis de caseína



Hidrólisis de caseína

- Proteína predominante en la leche
 - Proteína muy grande para pasar por la membrana pero algunas bacterias liberan caseinasa que degrada la proteína e incorporan los amino ácidos que se liberan
-

Hidrólisis de gelatina

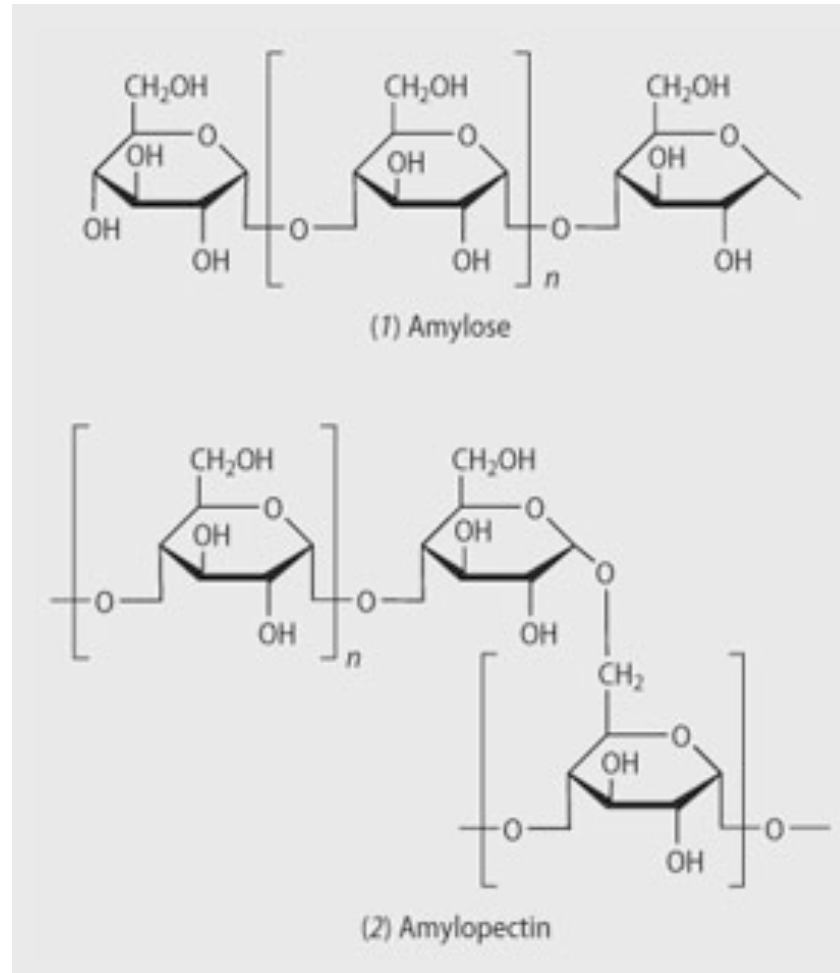


III.6 Gelatin hydrolysis. After hydrolysis (**1**), gelatin remains liquid. **2** is unhydrolyzed gelatin (Exercise 15).

Hidrólisis de gelatina

- Bacterias pueden producir la exoenzima gelatinasa, que rompe la estructura de la gelatina y la licúa
 - La capacidad de una bacteria de producir gelatinasa se puede correlacionar con el grado de patogenicidad o virulencia, ya que la enzima permite moverse a través del tejido conectivo en el cuerpo.
 - Una prueba gelatina se evalúa observando la consistencia en frío
 - Se utiliza para diferenciar entre *S. aureus* y *S. epidermidis*
-

Hidrólisis de almidón



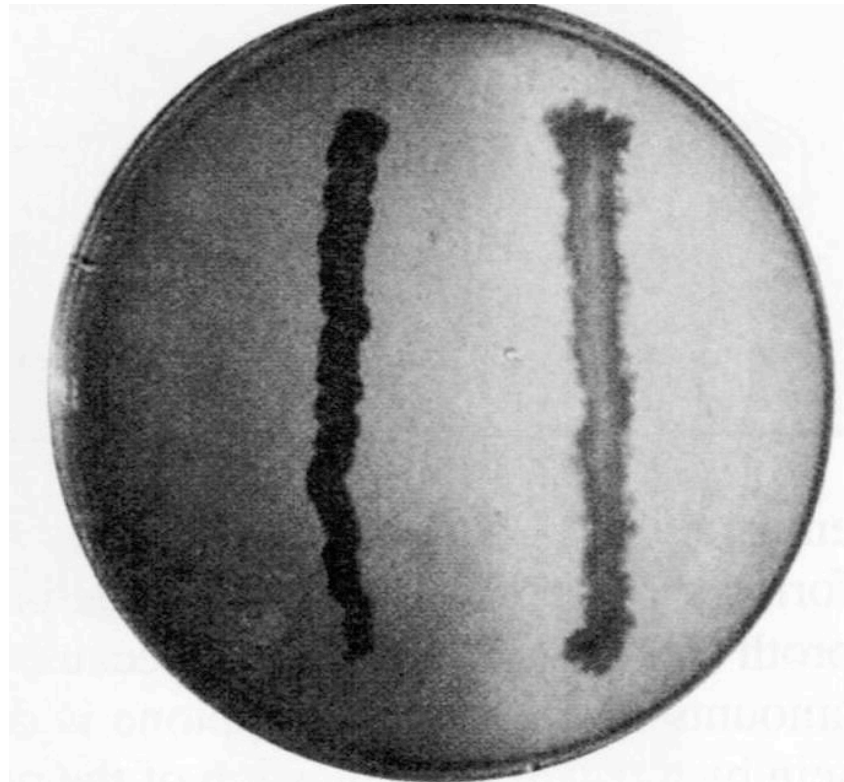
Hidrólisis de almidón



Hidrólisis de almidón

- Algunas bacterias pueden producir amilasa, produciendo dextrinas, glucosa y maltosa
-

Hidrólisis de lípidos



Fat

Dark blue pigmentation on left organism indicates it hydrolyzes fat.

Hidrólisis de lípidos

- Producción de lipasas para producir ácidos grasos y glicerol
 - Prueba se lleva a cabo en agar "Spirit Blue" que tiene un indicador de pH. La hidrólisis baja el pH ocurriendo un cambio de color a azul intenso
-

IMViC

- Para los bacilos Gram negativos
 - Indol
 - Rojo metilo (MR)
 - Voges Proskauer (VP)
 - Citrato (C)
-

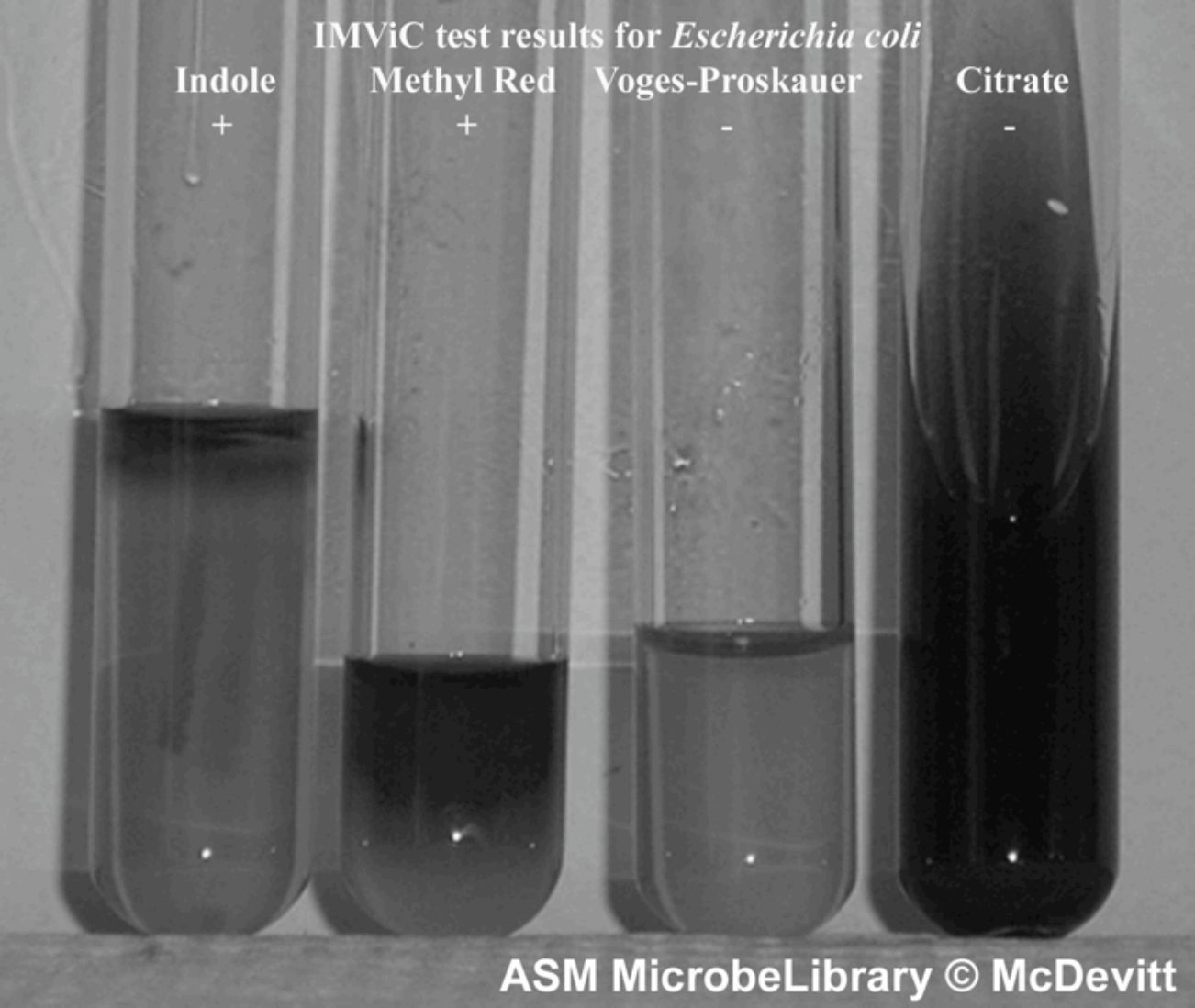
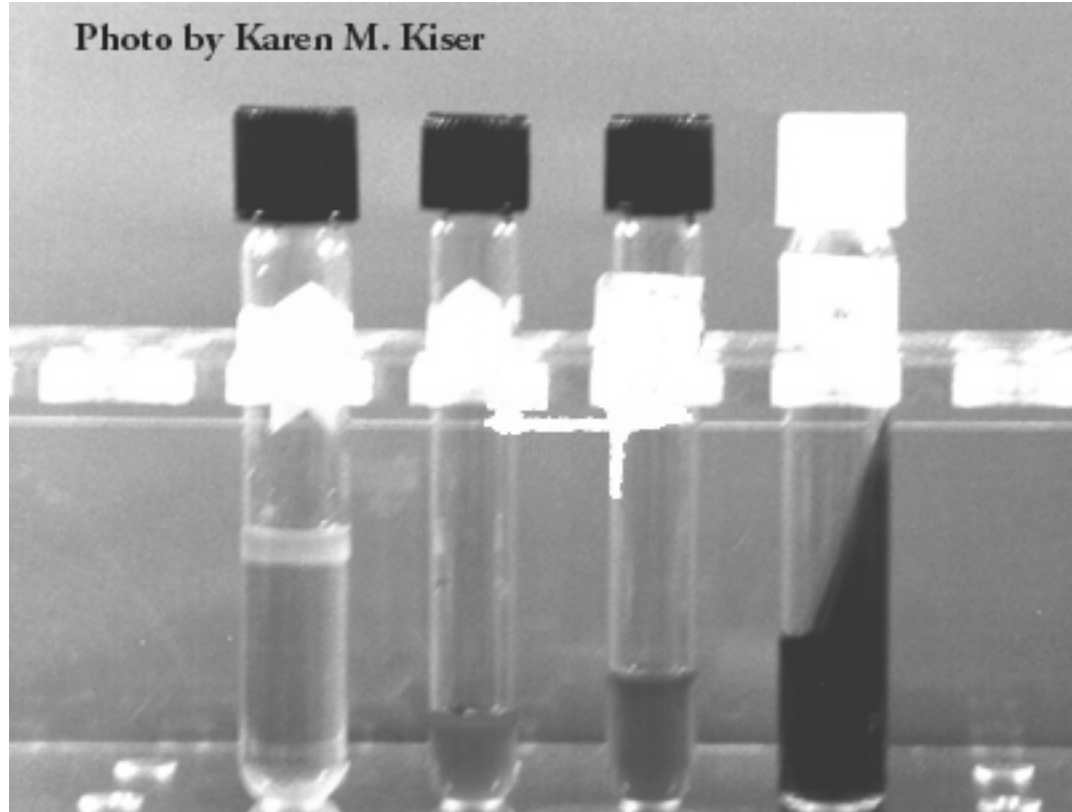


Photo by Karen M. Kiser



Prueba de indol

- Hidrólisis de triptófano produciendo indol, ácido pirúvico y amoníaco
 - El indol se acumula en el medio porque no es útil a la bacteria
 - Se añade reactivo de Kovac que reacciona con el indol produciendo un compuesto rojizo-rosado
-

Prueba rojo-metilo (MR)

- Prueba para la fermentación mixta-presencia de ácidos acéticos, lactico, fórmico y succínico
 - La adición de rojo de metilo, que distingue grados de acidez: amarillo a pH8, incoloro a pH 7 y rojo a pH de 4
-

Prueba Voges Proskauer

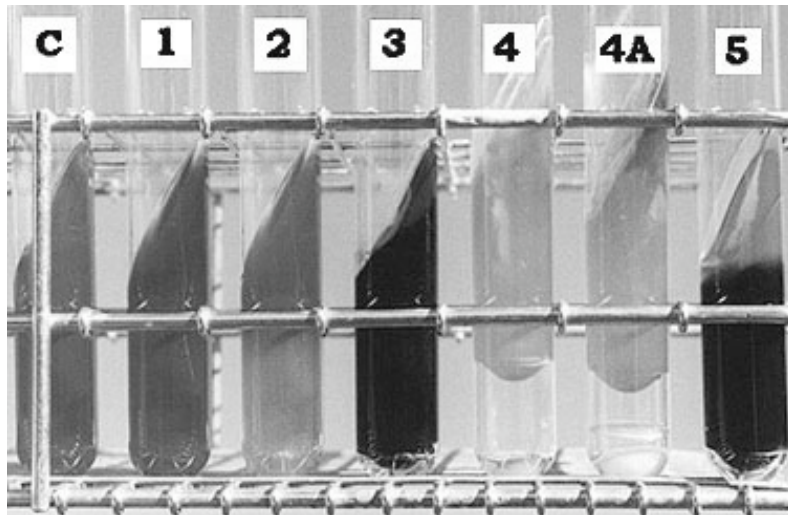
- Producción de alcohol y 2,3 butanodiol en lugar de ácidos a partir de un azúcar
 - Especies de *Enterobacter* y *Serratia* y algunas Gram positivo como *Bacillus*
 - Se mide acetoína que es un precursor de 2,3 butanodiol
 - Luego de período de incubación se añade el reactivo de Barrit: alfa-naftol 5% y KOH 40% en alcohol absoluto
 - Prueba positiva es la formación de un complejo rojo-rosado
-

Prueba de citrato

- Algunas bacterias pueden utilizar citrato como única fuente de carbono en condiciones aeróbicas
 - La permeasa de citrato permite el transporte de citrato al interior de la célula y la enzima citrasa convierte el citrato en ácido pirúvico y CO_2
 - Medio contiene citrato de sodio, sales de amonio y azul bromotimol como indicador de pH
 - El CO_2 liberado se combina con el sodio y agua y forman carbonato de sodio que es alcalino cambiando el bromotimol de verde a azul intenso
-

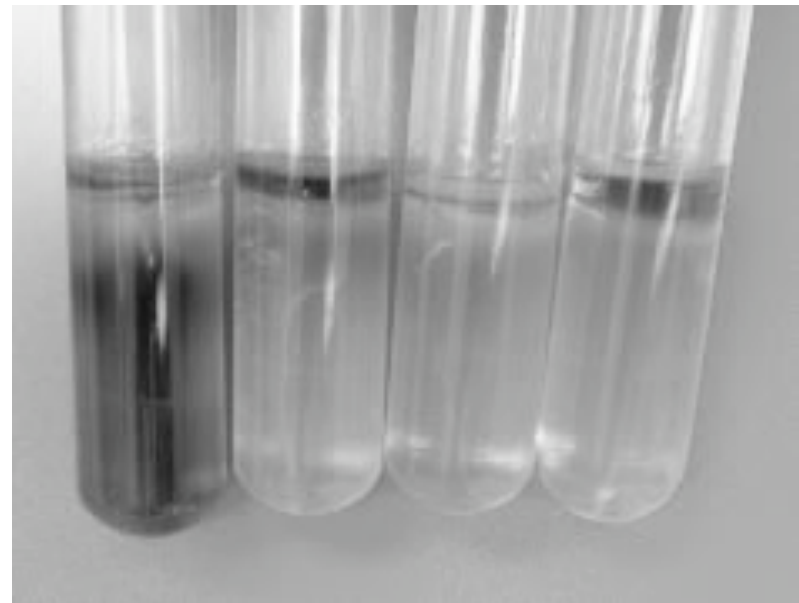
Otras pruebas relacionadas a amino ácidos-TSI, SIM

TSI- Triple Sugar Iron Agar



Fermentación de azúcares
y producción de H₂S

SIM- Sulfide Indole Motility



Producción de H₂S y motilidad

Deaminación de fenilalanina

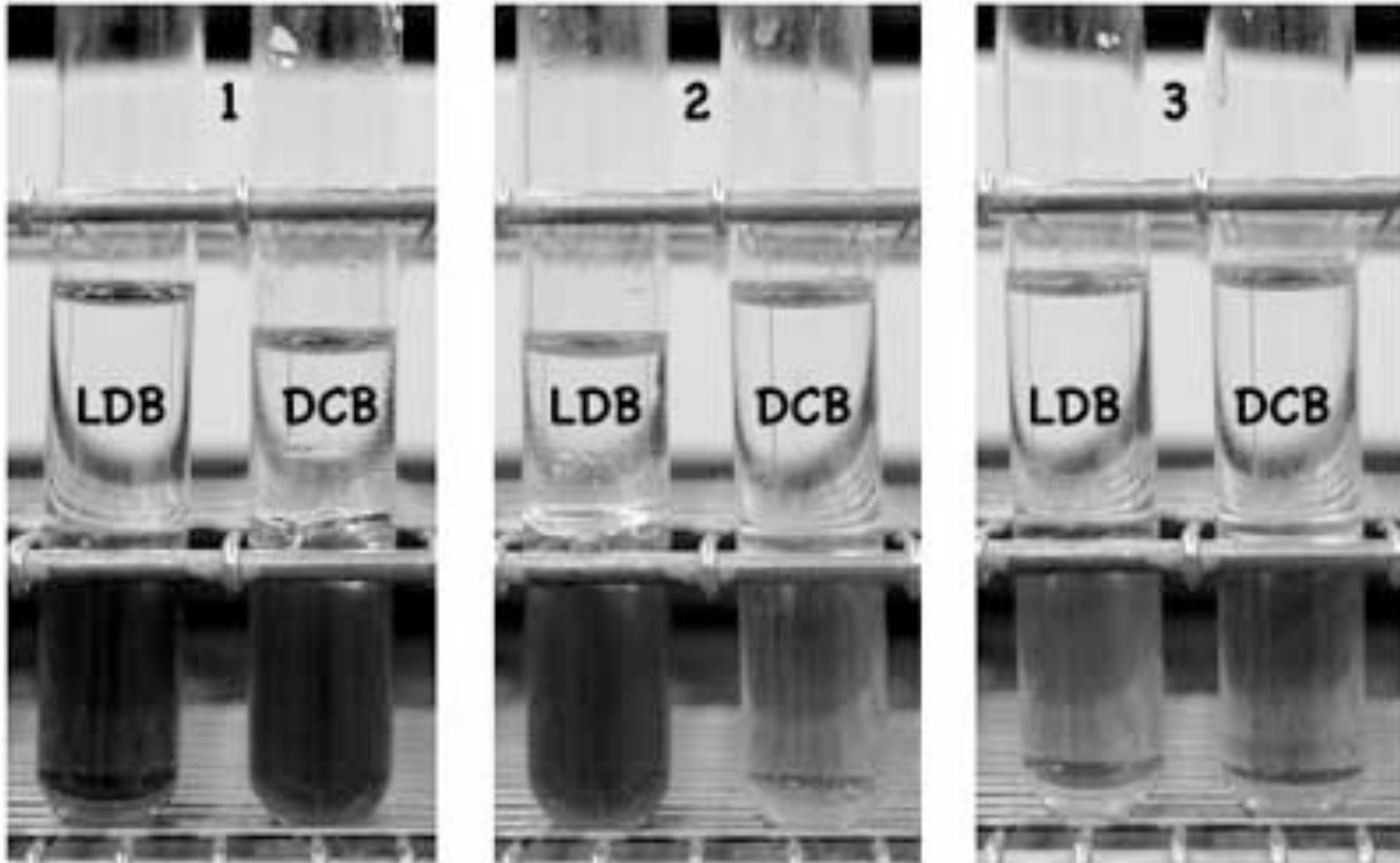
- Remoción del grupo amino de fenilalanina por fenilalanasa produciendo ácido fenilpirúvico
- Diferencia entre géneros de enterobacterias
- Se añade solución 10% cloruro férrico



Decarboxilación de ornitina y lisina

- Remoción del grupo carboxilo de los amino ácidos que producen aminas y CO_2
 - Se utilizan caldos que contienen el amino ácido correspondiente, glucosa y un indicador de pH como bromocresol violeta
 - Se añade aceite mineral para crear condiciones anaeróbicas
 - Los ácidos producidos por la fermentación activa la decarboxilasa que producen aminas alcalinas que neutralizan el medio lo cual cambia el medio de amarillo (ácido) a violeta
 - Prueba negativa- medio amarillo
-

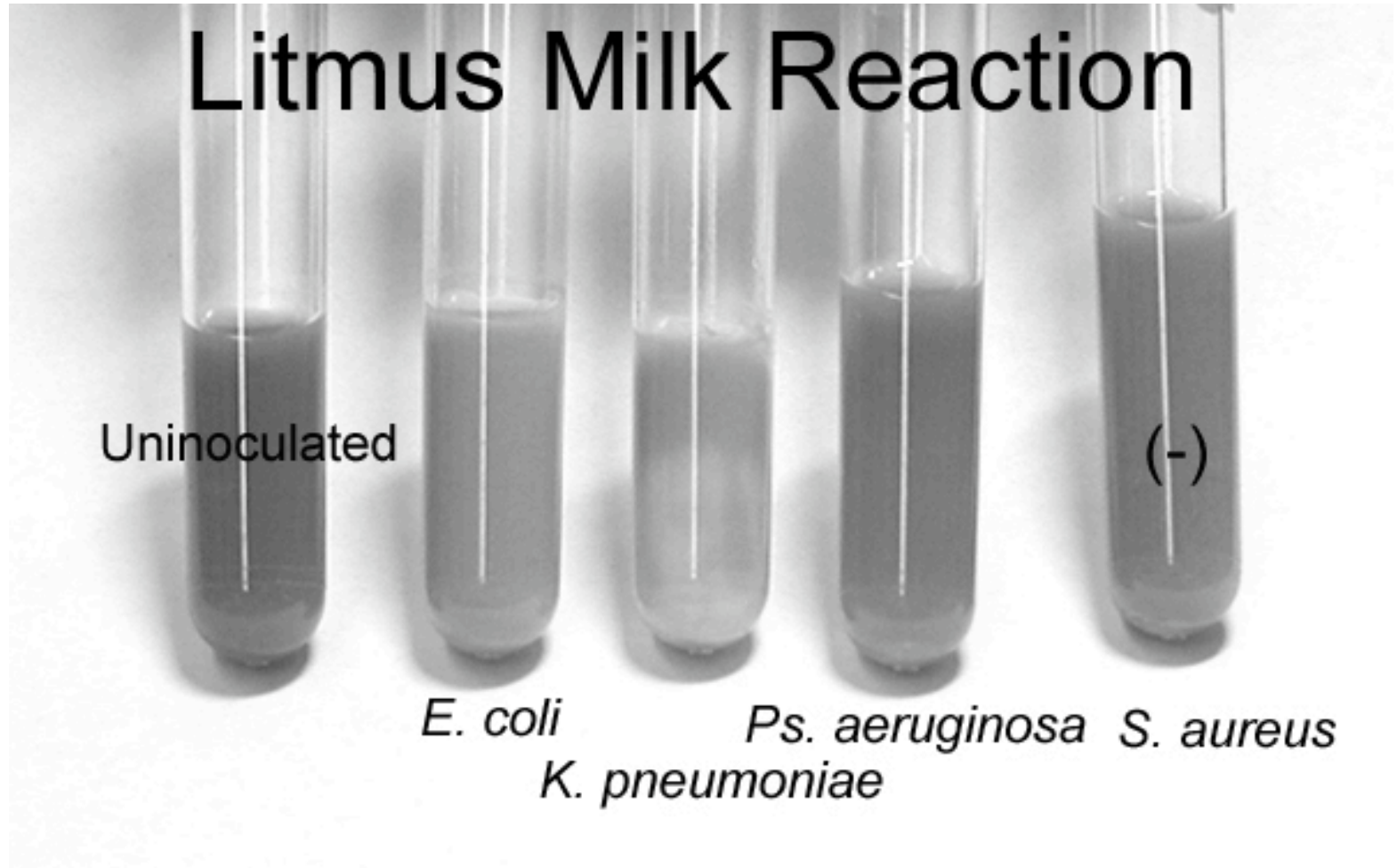
Decarboxilación de ornitina y lisina



Leche litmus

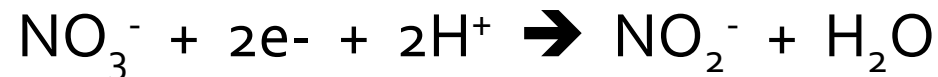
- Prueba que combina diferentes reacciones
 - Fermentación de azúcares
 - Lactosa
 - Reacciones de hidrólisis
 - Caseína
 - Leche desnatada al 10% con litmus (azolitim) como indicador de pH
-

Leche litmus



Prueba de nitrato

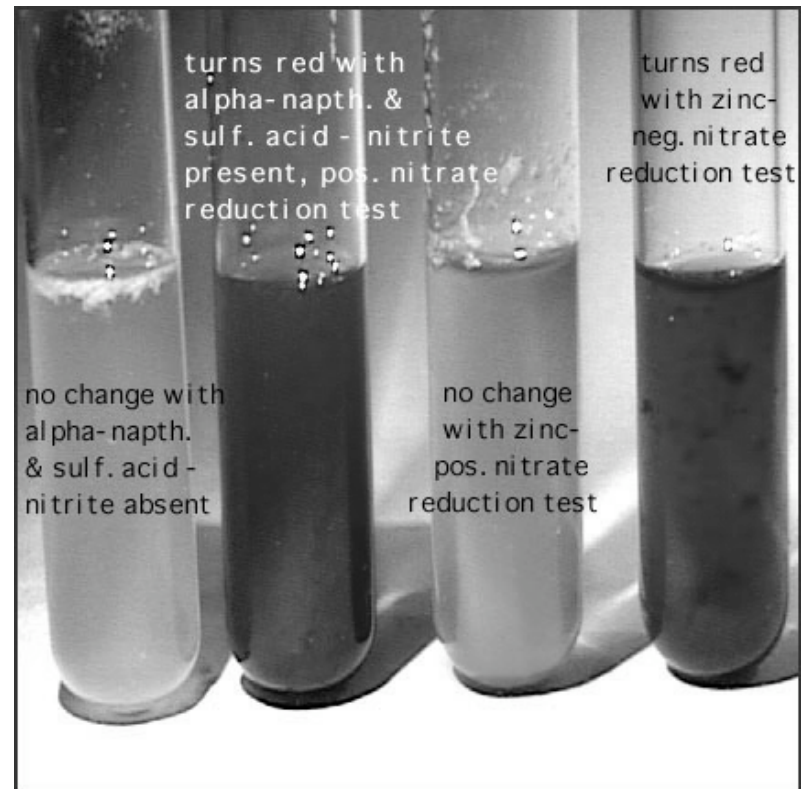
- Bacterias quimioorganoheterotróficas utilizan el nitrato como aceptador final de electrones durante respiración anaeróbica



- Relación al ciclo nitrógeno
 - El medio de cultivo contiene extracto de carne, peptona y nitrato de potasio (KNO_3)
-

Prueba de nitrato

- Se requiere la adición de ácido sulfanílico (A) y dimetil- α -naftilamina (B)
- Se detecta la presencia de nitrito
- Prueba positiva- color rojo
- Se confirma prueba negativa con Zn



Prueba de coagulasa

- Detecta la producción de una enzima que coagula las proteínas de la sangre
- Se hace en medio que tiene plasma
- Típica de las Gram positivo



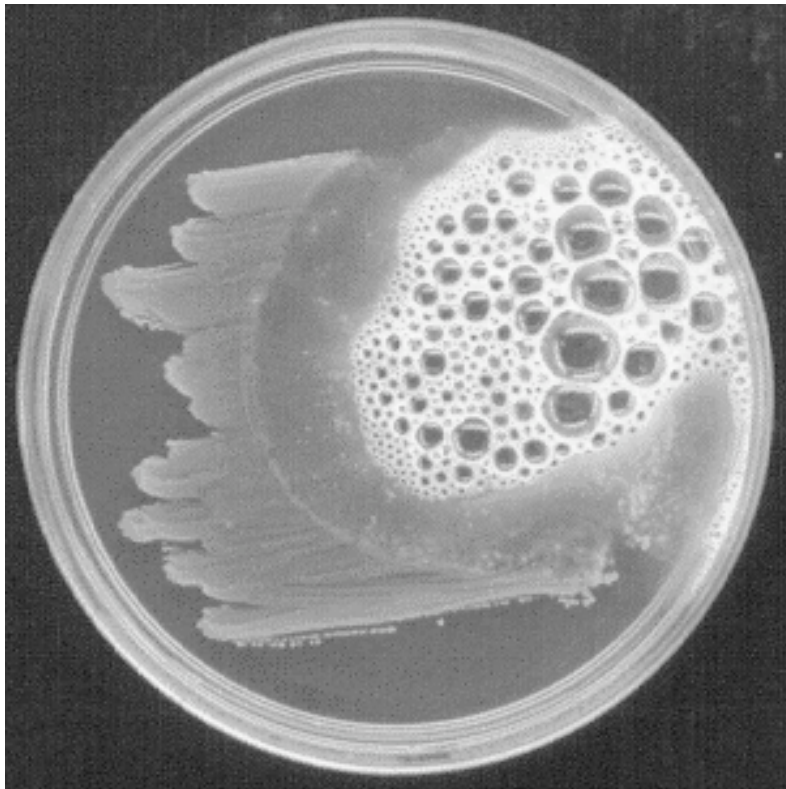
S. aureus

Prueba DNAsa

- Detecta presencia de deoxiribonucleasa
- Prueba típica para cocos Gram positivo
- Típico de bacterias patógenas que rompen DNA en células del hospedero
- El tinte se pega a las cargas negativas del DNA; ausencia del tinte, ausencia DNA



Prueba de catalasa

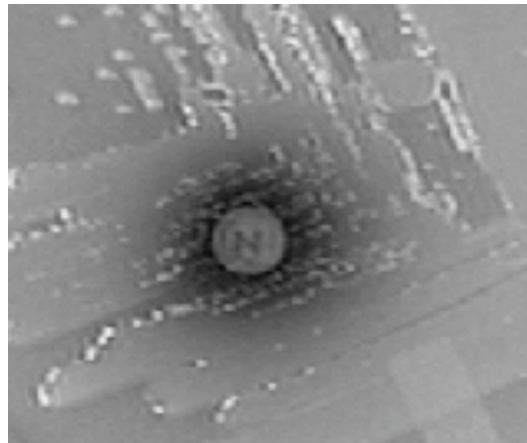
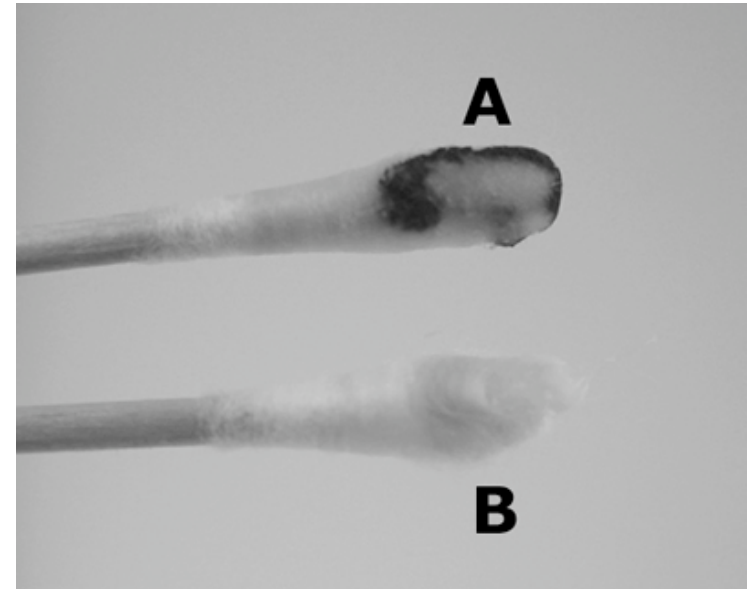


- Detecta presencia de catalasa o peroxidasa que rompe el peróxido en agua y O₂

Prueba de oxidasa

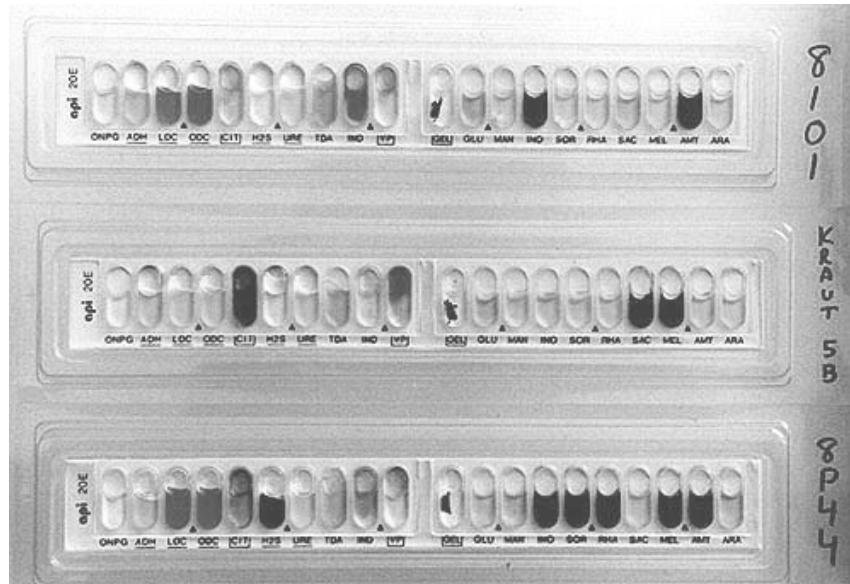
- Prueba representativa de los procesos aeróbicos propios de bacterias oxidativas
 - Bacterias oxidativas energía a partir de compuestos orgánicos utilizando oxígeno y liberando CO₂ y agua
 - Las oxidasas son enzimas importantes en la cadena de transporte de electrones durante respiración aeróbica
 - Prueba importante para distinguir ciertos grupos de bacterias
 - Prueba requiere el uso de tetrametil-p-fenilendiamina que reaccionan hacia un color azul oscuro al reaccionar con la citocroma c oxidada
-

Prueba de oxidasa



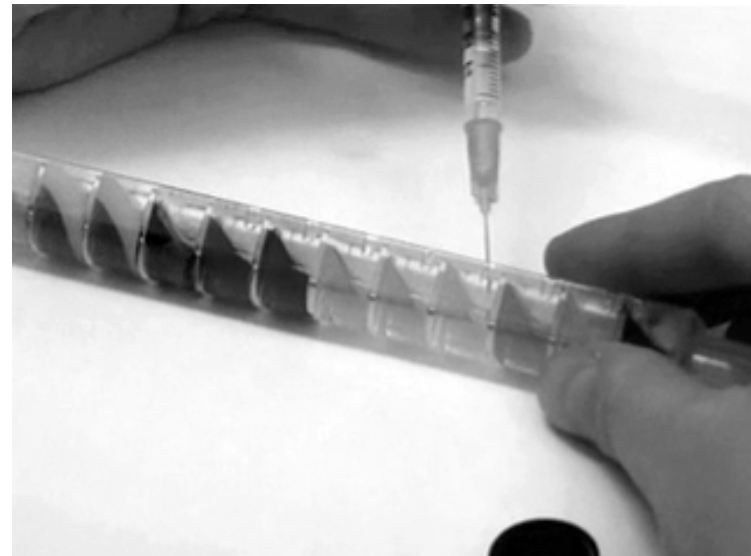
Las enterobacterias son oxidasa negativa

Sistemas miniturizados



API 20E

Enterotube II

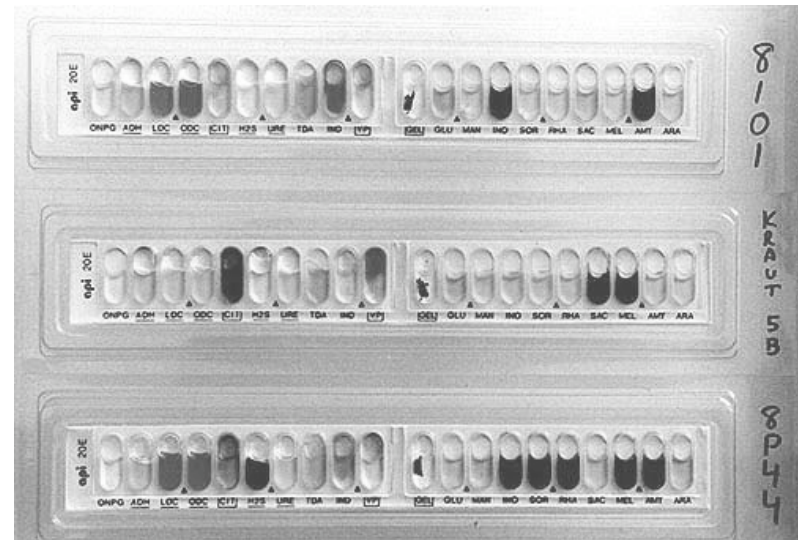


Pruebas rápidas

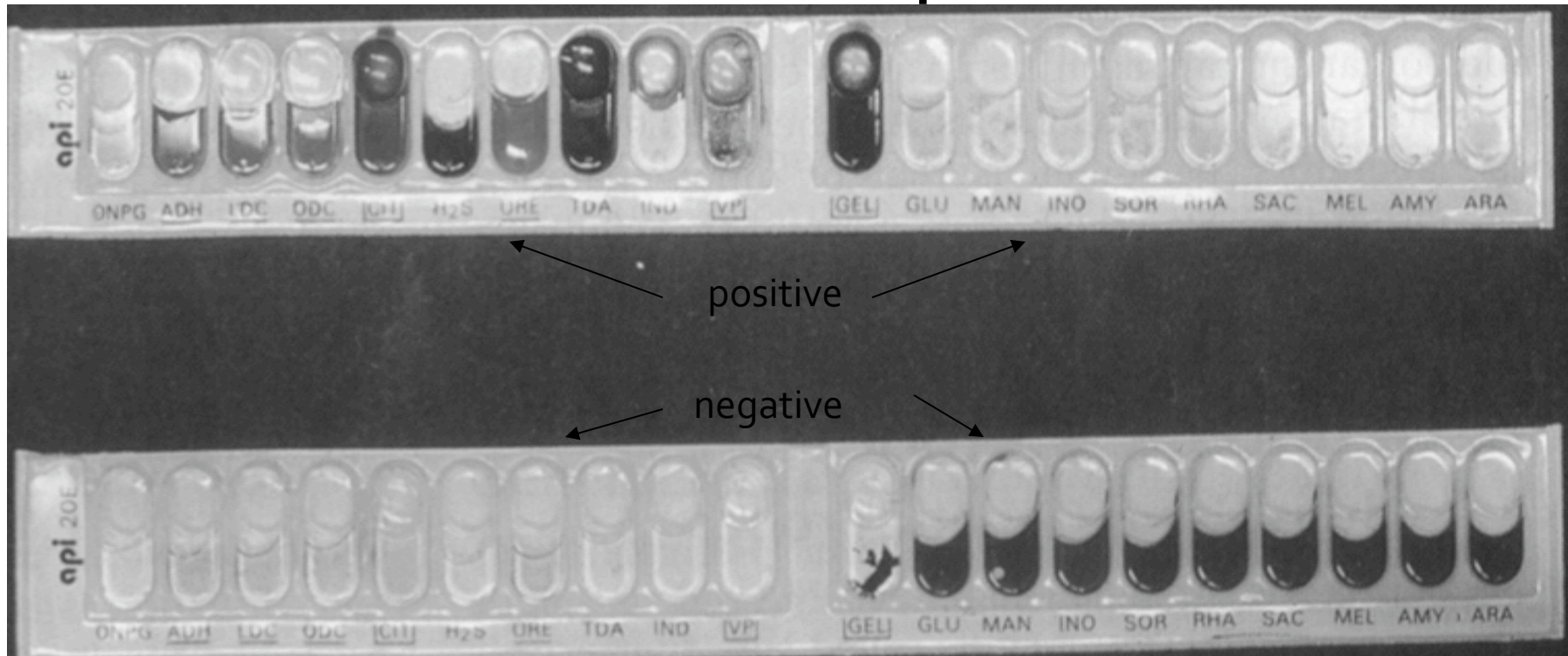
- **Pruebas rápidas:** sistema para la identificación bioquímica de *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram neg.
- Consiste de tiras plásticas con 20 ul de sustratos deshidratados que se utilizan para detectar características bioquímicas.
- Los sustratos son inoculados con cultivos puros suspendidos en salina.
- Luego de un período de 5hr – 24 hrs las 20 pruebas son convertidas a una lectura de 7-9 dígitos.

API 20E

- Limitado a bacterias Gram-, oxidasa neg



Pruebas rápidas



ONPG (β galactosidase); ADH (arginine dihydrolase); LDC (lysine decarboxylase); ODC (ornithine decarboxylase); CIT (citrate utilization); H₂S (hydrogen disulphide production); URE (urease); TDA (tryptophan deaminase); IND (indole production); VP (Voges Proskauer test for acetoin); GEL (gelatin liquefaction); the fermentation of glucose (GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), sucrose (SAC); Melibiose (MEL), amygdalin (AMY), and arabinose (ARA); and OXI (oxidase).

Pruebas rápidas- Resultados

OXI--0 \\
-
ARA-2 2
+
AMY-0
-

MEL--4 \\
+
SAC-2 7
+
RHA-1
+

SOR--4 \\
+
INO-0 5
-
MAN-1
+

normal 7 digit code
5 144 572 = *E. coli*

GLU--4 \\
+
GEL-0 4
-
VP--0

IND--4 \\
+
TDA-0 4
-
URE-0
-

H₂S--0 \\
-
CIT-0 1
-
ODC-1
+

LDC--4 \\
+
ADH-0 5
-
ONPG-1
+

Otros

- Enterotubo II- enterobacterias oxidasa neg
 - Enteric Tek
 - Oxi/Ferm Gram-Negative Rods Identification- para bacterias oxidasa pos y oxidasa – que no fermentan glucosa
 - API Staph-Ident- para 13 especies de estafilococos
 - Biolog
 - Micro-ID- enterobacterias oxidasa neg
 - Minitek
-