

PRUEBAS BIOQUÍMICAS:

Ramiro Olivera, Martín Pitkowski
Ayelen Rapaport, y Fabián Shalom

Cátedra de Microbiología – Escuela de Ciencia y Tecnología – Universidad Nac. De San Martín

OBJETIVOS:

- Realizar la prueba de la catalasa con *Staphylococcus* y determinar la presencia de dicha enzima.
- Identificar distintos géneros pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* a partir de distintas pruebas bioquímicas individuales y de un kit comercial (API20E).
- Determinar la sensibilidad de un cultivo bacteriano frente a diversos antibióticos, mediante sistemas de monodisco.

PROCEDIMIENTO:

Ver Guía de Trabajos Prácticos.

RESULTADOS:

Prueba de la Catalasa:

Se determinó la presencia de la enzima catalasa en un muestra de *estafilococos* resuspendida en agua. Luego del agregado de agua oxigenada, se observó un leve burbujeo, que corresponde al desprendimiento de oxígeno gaseoso como producto de la catálisis del agua oxigenada.

Prueba de la Oxidasa:

A partir de las dos muestras incógnitas A y B, una de las cuales correspondía a *enterobacterias*, se realizó la prueba de la oxidasa, resultando ser positiva la muestra A y negativa la muestra B. Se continuó trabajando solamente con la muestra B, que constaba de bacterias fermentadoras, ya que no poseen *citocromo c oxidasa*.¹

¹ A partir de la prueba de la oxidasa todas las pruebas se realizaron solamente con la muestra incognita B. La cual correspondía a alguna especie de *enterobacterias*.

Prueba de Hierro tres azúcares Kligler:

En el tubo de ensayo de agar Kligler, luego de entre 18 y 24 horas de incubación, se han observado las siguientes características: formación de un precipitado negro, superficie del agar de color rojizo y con colonias bacterianas, y ausencia de producción de gases. El precipitado negro se debe a la formación ácido sulfhídrico (H₂S) como producto del metabolismo, debido a que el mismo reacciona con el hierro del medio formando SFe (precipitado negro). La superficie rojiza se debe a que las bacterias sembradas no fermentan lactosa, ni sacarosa. Esta coloración se debe a una alcalinización del medio debido a la degradación de las peptonas. Debido a la ausencia de producción de gas se determinó que las bacterias eran anaeróbicas.

Pruebas IMViC (Indol, Rojo metilo, Voges Proskauer y Citrato):

Indol: En los tubos de agua triptonada, luego del agregado de unas gotas del reactivo de Kovacs, y tras unos minutos, se observó la aparición de una fase orgánica en la superficie de color rojo. Esto indica que la prueba es positiva, por lo tanto las bacterias poseen la enzima triptofanasa.

Rojo metilo: En la suspensión bacteriana luego de la incubación se agregó el indicador rojo de metilo, tornándose la muestra de color rojo. Esto es un resultado positivo de la prueba, es decir las bacterias realizan fermentación ácido mixta.

Voges Proskauer: Luego de la incubación se agregó hidróxido de potasio y α -naftol, la solución tomó una coloración amarillenta en la superficie. Esto indica que la prueba dio negativa, por lo cual las bacterias no realizan fermentación butilenglicólica.

Citrato: En esta prueba no se observó cambio de color en el medio de cultivo, ni desarrollo de colonias bacterianas. Esto indica que las bacterias no utilizaron citrato como fuente de carbono, por lo tanto no tienen el complejo enzimático citritasa.

Kit comercial de identificación bacteriana (API20E):

Los resultados obtenidos con el API20E y las pruebas bioquímicas realizadas, en cada uno de los *wells*, están dispuestas en la tabla 2. El cultivo bacteriano utilizado en este ensayo no fue el mismo que se utilizó para las pruebas anteriores. Este correspondía a un cultivo de enterobacterias utilizado por otro grupo de trabajo. A partir de los resultados de la tabla 2 se establece un valor numérico para cada una de las pruebas. Con estos valores se puede identificar especies bacterianas con una alta efectividad. El resultado numérico obtenido fue **3 305 773 (28)**.

Test	Reacción/Enzima	Resultado
ONPG	beta-galactosidase	+
ADH	Arginine dihydrolase	+
LDC	lysine decarboxylase	-
ODC	ornithine decarboxylase	+
CIT	citrate utilization	+
H ₂ S	H ₂ S production	-
URE	urease	-
TDA	tryptophane deaminase	-
IND	indole production	-
VP	Voges Proskauer	+
GEL	gelatinase	-
GLU	glucose fermentation/oxidation	+
MAN	mannitol fermentation/oxidation	+
INO	inositol fermentation/oxidation	+
SOR	sorbitol fermentation/oxidation	+
RHA	rhamnose fermentation/oxidation	+
SAC	sucrose fermentation/oxidation	+
MEL	melibiose fermentation/oxidation	+
AMY	amygdalin fermentation/oxidation	+
ARA	arabinose fermentation/oxidation	+
OX	cytochrome oxidase	-

Tabla 2 – Conjunto de pruebas bioquímicas analizadas y resultados alcanzados en el test API20E.

Sensibilidad a antibióticos (antibiograma):

El diámetro de los halos de inhibición con los diferentes antibióticos, medidos luego de 24 horas de incubación, se observan en la siguiente tabla:

Antibiótico	Concentración	Diámetro del halo	Sensibilidad
Cloranfenicol	30µg	36	Sensible
Gentamicina	10µg	17	Sensible
Tetraciclina	30µg	18	Intermedio / Sensible
Sulfonamida	10µg	15	No hay datos

Tabla 1 – Resultados obtenidos en el antibiograma.

El grado de sensibilidad de las bacterias frente a cada uno de los antibióticos fue determinada a partir del diámetro de los halos y tablas provistas por los fabricantes de los discos de antibiótico.

DISCUSION:

Las bacterias del género *Staphylococcus* son aerobias por lo tanto contienen la enzima *catalasa* para degradar el peróxido de hidrógeno. La prueba de la catalasa realizada con la resuspensión de *Staphylococcus* spp. dio positiva. Este resultado condice con la descripción para este género realizada por Madigan et. al (2004). Esta prueba bioquímica permite determinar solamente si la cepa utilizada es aerobia (estricta o facultativa) o anaerobia (estricta, aerotolerante o microaerófila), pero no permite distinguir entre géneros, ni especies.

El cultivo incógnita A no es fermentador, debido a que es oxidasa positiva, por lo tanto no es una enterobacteria. Por esta razón no se continuó trabajando con este cultivo.

La muestra incógnita B es fermentadora, ya que es oxidasa negativa. Esto indica que puede ser una enterobacteria. Para identificar la muestra incógnita se realizaron las pruebas de Kliegler e IMViC. A partir de los resultados obtenidos en la prueba de Kliegler se pudo determinar que la especie incógnita es anaerobia, fermenta glucosa, no fermenta lactosa, ni sacarosa, produce ácido sulfhídrico y es anaerogénica. Entre los géneros que reúnen estas características se encuentra *Proteus* spp., no así *Klebsiella* spp. Los resultados del IMViC fueron ++-+. Las *Escherichia coli* y *P. vulgaris* tienen como característica ser rojo metilo positivo, Voges Proskauer negativo e indol positivo. La muestra incógnita es citritasa negativa, por lo tanto puede ser *Proteus*, *E. coli*, pero no puede ser *Salmonella*, ni *Klebsiella*. Las bacterias en cuestión no pueden ser *Enterobacter* spp. ni *Salmonella* spp. porque estas son indol negativas, tampoco puede tratarse de *E. coli*. ya que esta fermenta lactosa y sacarosa. A partir de los resultados obtenidos y según datos bibliográficos el género de la incógnita podría ser *Proteus*. A fin de determinar la especie en cuestión deberían realizarse mas pruebas bioquímicas, por ejemplo empleando kits comerciales como el API20E.

Para realizar la identificación bacteriana, el resultado numérico del API20E debe ser ingresado en la base de datos del fabricante del mismo. Si bien no se pudo acceder a esta base de datos, se pudieron conocer diferentes características bioquímicas de la muestra en cuestión.

El tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano no tiene relación lineal con el efecto bactericida de los antibióticos utilizados, ya que el mismo esta relacionado también con la concentración del mismo y con la capacidad de difusión del antibiótico en el medio. Para determinar la sensibilidad de una determinada especie frente a un antibiótico, se realiza una comparación con datos conocidos. A partir de estas tablas de datos, se pudo determinar que la muestra incógnita B presentaba sensibilidad frente al cloranfenicol y a la gentamicina,

mientras que presentaba una menor sensibilidad frente a tetraciclina. En el caso de la sulfonamida, no pudo establecerse la sensibilidad ya que no se encontraron datos comparativos.

CONCLUSIONES:

Se logró determinar la presencia de la catalasa en el cultivo de *Staphylococcus* spp por medio de la prueba de la catalasa.

A partir de las pruebas bioquímicas (oxidasa, Kliegler e IMViC) se pudo determinar que la muestra incógnita podría pertenecer al género *Proteus*. Para determinar con mayor certeza que este es el genero bacteriano; asimismo como para identificar la especie de la muestra incógnita se deberían realizar mas pruebas bioquímicas.

Por medio del uso del antibiograma, se logró determinar la sensibilidad de la muestra incógnita frente a algunos antibióticos. Para la sulfonamida no pudo determinarse la sensibilidad, ya que no se contaba con la información necesaria.

BIBLIOGRAFÍA:

Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. (2004) Brock: Biología de los Microorganismos – 10ma Edición – ISBN:84-205-3679-2

Prescott L.M., Harley J.P. y Klein D.A. (2003) Microbiología – 4ta Edición – ISBN:84-486-0261-7