

## B) Diferenciación bioquímica

A partir de los cultivos puros de los diferentes tipos de colonias se siembra en medios de cultivo específicos para diferenciación bioquímica de los microorganismos.

Las pruebas más importantes se describen a continuación:

**Prueba de motilidad.** Sembrar por picadura en medio de agar semisólido. Se incuba a 35°C durante 24 horas. El crecimiento difuso en el medio indica la motilidad del microorganismo.

**Prueba de indol.** Sembrar por picadura en un tubo con medio de SIM o caldo triptona, se incuba a 35°C durante 24 horas, se agregan 0.5 ml. de reactivo de Kovacs. La prueba es positiva cuando se forma un anillo púrpura en la superficie del medio.

**Prueba de Voges Proskauer** (acetil-metil-carbinol o acetoína). Sembrar en un tubo con cinco ml. de medio MR-VP incubar a 35°C durante 48 horas. A un ml. del cultivo agregar 0.6 ml. de reactivo de alfa-naftol y 0.2 ml. de una solución de hidróxido de potasio al 40 por ciento.

Agitar bien y dejar reposar de dos a cuatro horas. Si se ha producido acetil-metil-carbinol, se formará un color rojo anaranjado brillante en la superficie del tubo, que gradualmente se irá difundiendo en el medio.

**Prueba del rojo de metilo.** Inocular un tubo con cinco ml. de medio MR-VP, incubar a 37°C durante 48-96 horas. Agregar cinco gotas de reactivo de rojo de metilo. La reacción positiva la indica un color rojo intenso.

**Reducción de nitratos.** Inocular un tubo con medio de caldo peptona + 0.1 de KNO<sub>3</sub>, incubar a 35°C durante 48 horas. Agregar cinco gotas de alfa-naftilamina (0.6 por ciento en ácido acético glacial) y cinco gotas de ácido sulfanílico (0.8 por ciento en ácido acético glacial). Una coloración roja en el medio después de agregar los reactivos indica una prueba positiva.

**Prueba de oxidación-fermentación.** Sembrar por picadura en dos tubos con medio de OF Hugh Leifson. En uno de los tubos después de inocular, se cubre la superficie con parafina blanda. Incubar a 35°C durante 48 horas. Las bacterias oxidantes muestran producción de ácido (amarillo) solo en la parte superficial del tubo sin parafina y las fermentadoras muestran ácido en ambos tubos.

**Utilización de citratos.** Sembrar en la superficie de un medio inclinado de Simmons, incubar a 35°C durante 24-48 horas. La prueba será positiva al cambiar el medio de color verde a azul.

**Prueba de oxidasa.** Impregnar un trozo de papel filtro con unas gotas de reactivo de di o tetra metil-parafenilendiamina recién preparado. Recoger con asa bacteriológica de platino una colonia y extenderla sobre el papel impregnado con el reactivo. La reacción positiva se reconoce por un color púrpura oscuro que aparece sobre el papel a los 5 o 10 segundos.

**Prueba de catalasa.** Inocular un tubo con caldo nutritivo, incubar a 35°C durante 48 horas. Agregar unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento. Observar la aparición de burbujas y acumulación de espuma en la superficie del medio, lo que indicará una prueba positiva.

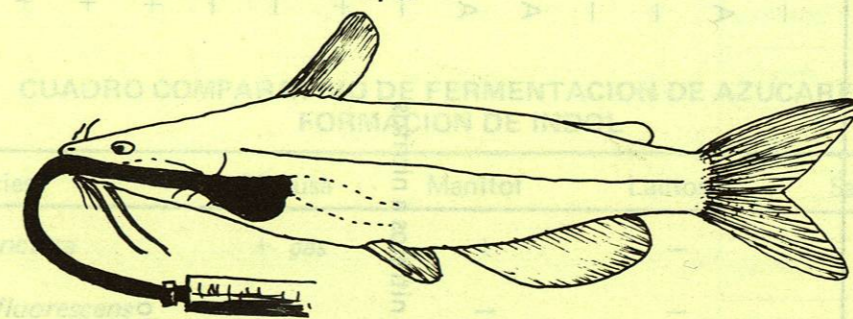
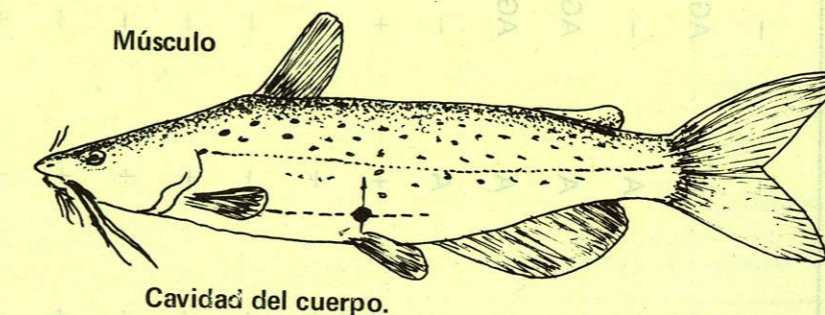
**Hidrólisis del almidón.** Inocular por estría una placa de Petri con agar almidón, incubar a 35°C durante 48 horas y para investigar la acción diastásica, cubrir la superficie del medio con una solución de yodo (Iugol). El medio se tiñe de púrpura, excepto alrededor del crecimiento bacteriano, en donde se observa una zona clara, lo que indica una prueba positiva.

**Hidrólisis de la gelatina.** Inocular un tubo de gelatina nutritiva, incubar a 35°C durante 48 horas. Refrigerar los tubos por 30 minutos. La prueba será positiva cuando el medio de cultivo no solidifique al ser refrigerado.

**Acción sobre los carbohidratos.** Inocular tubos con campana de fermentación conteniendo medio de caldo púrpura de bromocresol o caldo rojo fenol adicionados de 0.5 por ciento de los diferentes carbohidratos en estudio, incubar a 35°C durante 48 horas. La prueba será positiva cuando el indicador cambie a color ácido (amarillo en ambos medios de cultivo), lo que indica la fermentación de carbohidrato y la producción de gas será positiva cuando se aprecien burbujas en la campana de fermentación. Leer cada una de las pruebas bioquímicas y de acuerdo a su morfología y afinidad hacia los colorantes, identificar las bacterias haciendo uso de las tablas específicas.

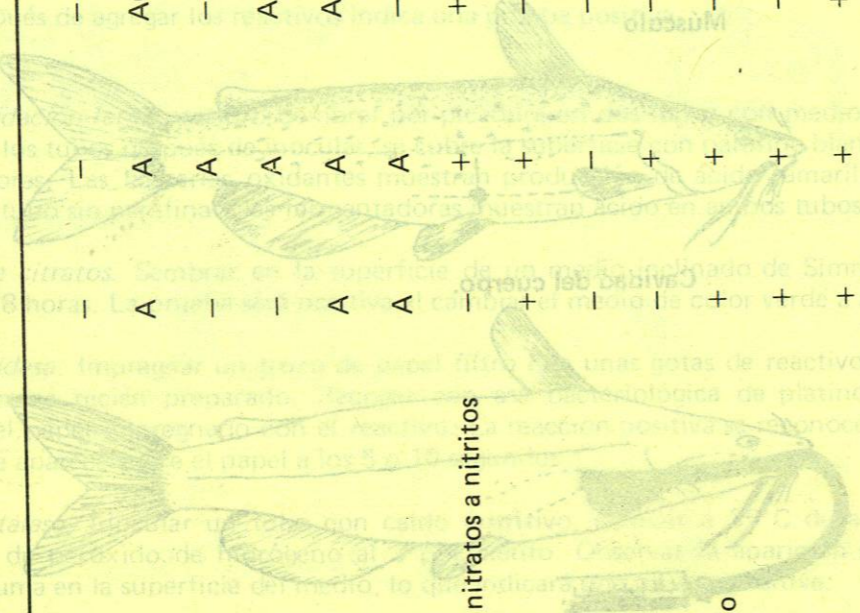
## C) Determinación de la patogenicidad de las bacterias aisladas

Muchas de las bacterias que se aíslan de peces son saprofíticas que actúan como patógenos bajo ciertas condiciones. Cultivos de bacterias aislados de peces deberán ser inoculados en hospederos de la misma especie. La presencia de síntomas clínicos idénticos a los que presentaba el pez enfermo de donde se hizo el aislamiento; indica una prueba positiva. Las inoculaciones artificiales pueden hacerse en la cavidad del cuerpo, en músculos o en el intestino del pez.

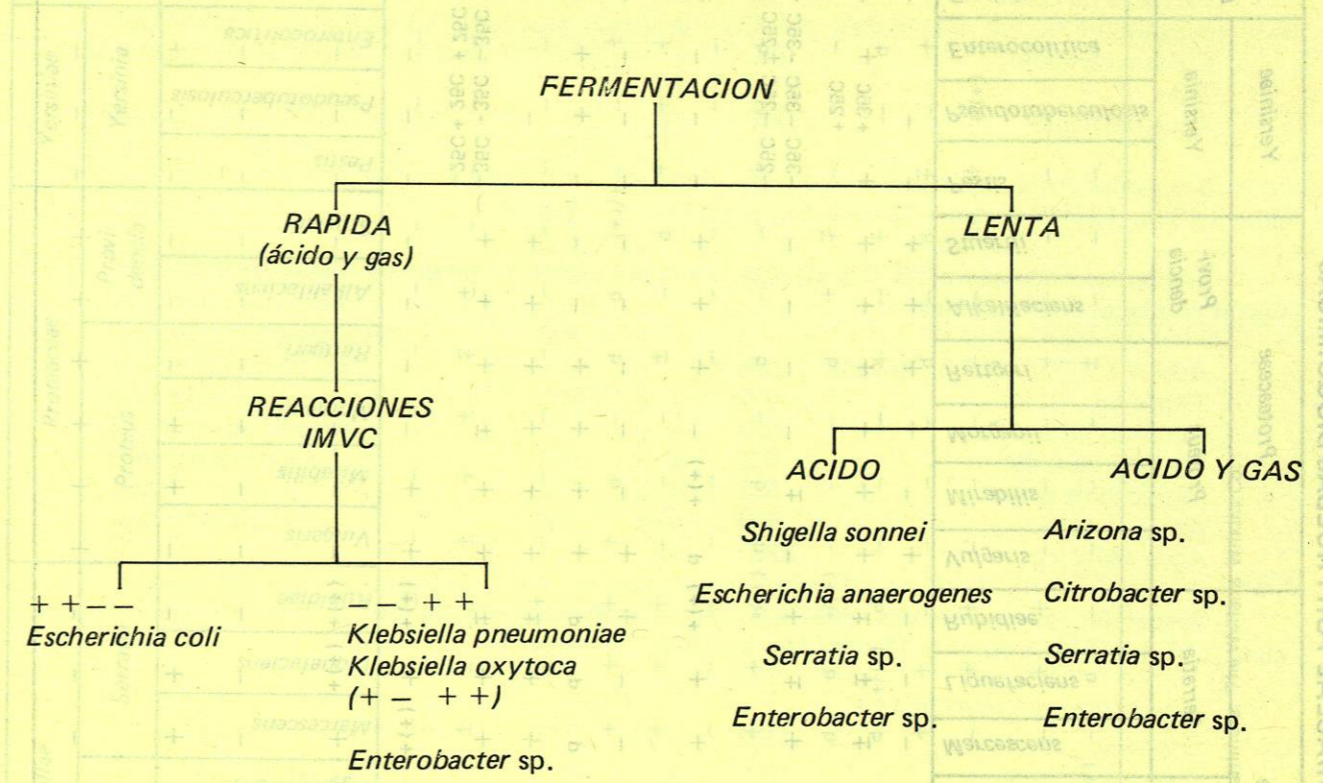


CARACTERISTICAS DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE PECES ENFERMOS

	Pseudomonas fluorescens	Pseudomonas spp.	Aeromonas salmonicida	Edwardsiella tarda	Yersinia ruckeri	Vibrio anguillarum	Aeromonas spp.	Aeromonas hydrophila	Aeromonas punctata
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	A	A	AG	AG	A	A	AG	AG	AG
Lactosa	-	A	-	-	-	-	A	-	A
Maltosa	-	A	AG	-	-	A	AG	AG	AG
Manitol	A	A	AG	-	A	A	AG	AG	AG
Sacarosa	A	A	-	-	-	A	A	AG	AG
Reducción de nitratos a nitritos	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+	+	-	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	+	+	±	+	+	+
Indol	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Rojo de Metilo	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Acetoína	+	+	-	-	-	±	+	+	+
Oxidasa	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Novobiocina	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Símbología	A = Acido G = Gas								



DIFERENCIACION DE ENTEROBACTERIACEAE POR FERMENTACION DE LA LACTOSA



CUADRO COMPARATIVO DE FERMENTACION DE AZUCARES Y FORMACION DE INDOL

Especies	Glucosa	Manitol	Lactosa	Sacarosa	Indol
<i>Aeromonas punctata</i>	+ gas	+	-	-	±
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas subrubra</i>	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	+	-	-	-	-



**MEDIOS DE CULTIVO**

**AGAR SANGRE**

Extracto de carne	3.0	g
Peptona	5.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Agar	15.0	g
Agua destilada	1000	ml

Suspender los componentes en el agua destilada, hervir durante dos minutos, esterilizar el autoclave a 15 lb (121°C) durante 15 minutos, pH final 7.4 ± 0.2.

Enfriar por debajo de 55°C y agregar cinco por ciento de sangre de carnero desfibrinada estéril. Verter en placas Petri estériles.

**AGAR CYTOPHAGA (Anacker y Ordal)**

Triptona	0.5	g
Extracto de levadura	0.5	g
Acetato de sodio	0.2	g
Extracto de carne	0.2	g
Agar	9.0	g
Agua destilada	1000	ml

Suspender los ingredientes en el agua destilada, hervir durante dos minutos, esterilizar en autoclave a 15 lb (121°C) durante 15 minutos. pH final 7.2 ± 0.2.

**AGAR SOYA TRIPTICASA**

Triptona	15.0	g
Peptona de soya	5.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Agar	15.0	g
Agua destilada	1000	ml

Suspender los ingredientes en el agua destilada, hervir durante dos minutos, esterilizar en autoclave a 15 lb (121°C) durante 15 minutos, pH final 7.3 ± 0.2.

**AGAR CETRIMIDA**

Peptona	20.0	g
Cloruro de magnesio	1.4	g
Sulfato de potasio	10.0	g
Agar	13.6	g
Cetrimida	0.3	g
Glicerina	10.0	ml
Agua destilada	1000	ml

Suspender el polvo en agua, agregar 10 ml de glicerina, calentar agitando frecuentemente y dejar hervir un minuto. Esterilizar en autoclave a 15 lb (121°C) durante 15 minutos, pH final 7.2 ± 0.2.

**AGAR MacConkey**

Peptona	17.0	g
Lactosa	10.0	g
Proteosa peptona	3.0	g
Sales biliares	1.5	g
Cloruro de Sodio	5.0	g
Rojo Neutro	0.03	g
Cristal violeta	0.001	g

**GELATINA NUTRITIVA**

Agua destilada	13.5	g
	1000	ml

Suspender los ingredientes en el agua destilada y calentar a ebullición por un minuto. Esterilizar en autoclave a 15 lb/15 min. pH final 7.1 ± 0.1

**MEDIO DE RIMBLER SHOTTS**

Lisina	5.0	g
Ornitina	6.5	g
Cisteina	0.3	g
Maltosa	3.5	g
Tiosulfato de sodio	6.8	g
Azul de bromotimol	0.03	g
Citrato férrico-amónico	0.8	g
Desoxicolato de sodio	1.0	g
Novoviocina	0.005	g
Extracto de levadura	3.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Agar	13.5	g
Agua destilada	1000	ml

Disolver los ingredientes, hervir por un minuto con agitación, ajustar el pH a 7.0, enfriar a 45°C y distribuir en placas Petri. NO ESTERILIZAR.

**MEDIO BASE OF DE HUGH Y LEIFSON**

Peptona	2.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Fosfato de potasio	0.3	g
Agar	3.0	g
Agua destilada	1000	ml
Azul de bromotimol		
(sol. alc. al 0.2 por ciento)	15	ml

Disolver los ingredientes en agua destilada, ajustar el pH a 7.1, filtrar, agregar el indicador. Esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos. Asépticamente agregar una solución estéril (esterilizada por filtración) del carbohidrato para tener una concentración final de uno por ciento. Mezclar y distribuir en tubos estériles.

**CALDO CON HIDRATOS DE CARBONO**

Caldo infusión cerebro corazón	1000	ml
Hidratos de carbono		
(sol. al 10 por ciento)	100	ml
Indicador (1.6 g de púrpura de bromocresol en 100 ml de etanol de 95°)	1	ml

Mezclar los tres ingredientes, distribuir en tubos de ensayo con campana de fermentación. Esterilizar en autoclave a 15 lb (121°C) durante 10 minutos.

**CALDO INFUSION CEREBRO CORAZON**

Infusión de cerebro de ternero	200.0	ml
Infusión de corazón de res	250.0	ml
Proteosa peptona	10.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g

Fosfato disódico	2.5	g
Glucosa	2.0	g
Agua destilada cbp	1000	ml

Disolver los ingredientes en agua destilada, hervir por un minuto. Esterilizar en autoclave por 15 lb durante 15 minutos. pH final  $7.4 \pm 0.2$

#### MEDIO SIM

Extracto de carne	3.0	g
Peptona	3.0	g
Fierro peptonizado	0.2	g
Agar	3.0	g
Tiosulfato de sodio	0.025	g
Agua destilada	1000	ml

Suspender los ingredientes en agua destilada, hervir durante dos minutos con agitación. Esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos. pH final  $7.4 \pm 0.2$ .

#### CALDO MR VP

Peptona	10.0	g
Destrosa	5.0	g
Fosfato dipotásico	5.0	g
Agua destilada	1000	ml

Disolver los ingredientes en agua destilada, esterilizar en autoclave durante 15 minutos, pH final  $6.9 \pm 0.2$ .

#### AGAR CITRATO DE SIMMONS

Fosfato de amonio	1.0	g
Fosfato de potasio	1.0	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Citrato de sodio	2.0	g
Sulfato de magnesio	0.2	g
Azul de bromotimol	0.08	g
Agar	15.0	g
Agua destilada	1000	ml

Suspender los ingredientes en el agua destilada. Esterilizar en autoclave a 15 lb/15 min. pH final  $6.8 \pm 0.2$ .

#### MEDIO DE JENSEN MAS HUEVO

600 ml. de solución stock de Loewenstein (4.0 g. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 1 g. de citrato de magnesio + 0.4 g. de sulfato de magnesio + 6.0 g de asparagina + 20 g de glicerina destilada dos veces, en un litro de agua destilada), se hierven por dos horas se enfría, se agregan 30 g de almidón de papa, se hierve en baño de agua agitando continuamente hasta formar una pasta, reposar por una hora a  $56^\circ\text{C}$ , agregar un litro de emulsión de huevo, agitar bien y agregar 20 ml de solución acuosa de verde de malaquita al dos por ciento. Distribuir en tubos y dejar solidificar. Esterilizar el primer día a  $85^\circ\text{C}$  por 30 minutos y el segundo día, a  $75^\circ\text{C}$  por 30 minutos. La concentración de glicerina deberá ser de 0.74 por ciento.

#### MEDIO DE AMLACKER CON HUEVO

160 ml de emulsión de huevo + 95 ml de NaCl al 0.64 por ciento + 5 ml de glicerina destilada dos veces + 5 g de harina de papa o 1 g de peptona + 2 g de asparagina + 10 ml de verde de malaquita (solución acuosa al 10 por ciento).

#### GELATINA NUTRITIVA

Extracto de carne	3.0	g
Peptona	5.0	g
Gelatina	120.0	g
Agua destilada	1000	ml

Agregar la gelatina al agua y dejar reposar por 15 a 30 minutos. Calentar para disolver la gelatina, agregar y disolver los otros ingredientes. Esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos, pH 7.0.

#### CALDO TRIPTONA

Disolver 10 g de triptona en un litro de agua destilada, distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave a 15 lb ( $121^\circ\text{C}$ ) durante 15 minutos.

#### CALDO NITRATO

Peptona	1.0	g
KNO <sub>3</sub>	0.1	g
Agua destilada	100	ml.

Disolver los ingredientes, esterilizar en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

#### AGUA PEPTONADA

Peptona	1.0	g
Na Cl	0.5	g
Agua destilada	100	ml

Disolver los ingredientes, esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos.

#### CALDO NUTRITIVO

Extracto de carne	3.0	g
Peptona	5.0	g
Agua destilada	1000	ml

Disolver los ingredientes, esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos, pH 7.4.

#### AGAR NUTRITIVO

Extracto de carne	3.0	g
Peptona	5.0	g
Agar	15.0	g
Agua destilada	1000	ml

Disolver los ingredientes, esterilizar en autoclave a 15 lb durante 15 minutos, pH 7.4.

#### AGAR FUCSINA SACAROSA

A 100 ml de agar nutritivo agregar 1 ml. de una solución de NaOH al 10 por ciento y 1 g. de sacarosa que previamente fue disuelta en 2 a 3 ml de agua estéril. Enseguida agregar 0.5 ml de una solución alcohólica de fucsina con pipeta estéril y 2.5 ml. de una solución preparada con 1 g. de sulfato de sodio. ( $\text{NaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) disueltos en 10 ml. de agua estéril, calentando sin ebullición. El medio se vierte en placas Petri.

#### REACTIVOS Y COLORANTES

##### REACTIVO PARA PRUEBA DE OXIDASA

Cloridrato de tetra-metil-p, fenilen-diamina	1	g
Agua destilada	100	ml

**REACTIVO DE KOVACS**

Para-di-metil-amino-benzaldehido	5.0 g
Alcohol amílico	75 ml
Acido clorhídrico concentrado	25 ml

Disolver el benzaldehido en el alcohol amílico y agregar lentamente el ácido clorhídrico. Conservar en frasco obscuro.

**SOLUCION DE ROJO DE METILO**

Rojo de metilo	0.10 g
Alcohol etílico	300 ml
Agua destilada	200 ml

Disolver el rojo de metilo en el alcohol y mezclar con el agua.

**SOLUCION DE ALFA NAFTOL**

Alfa naftol	5.0 g
Alcohol etílico	100 ml

**SOLUCION DE HIDROXIDO DE POTASIO AL 40 POR CIENTO**

Hidroxido de potasio	40.0 g
Agua destilada	100 ml

**SOLUCION DE CRISTAL VIOLETA**

Cristal violeta	2.0 g
Alcohol etílico (95 por ciento)	20 ml
Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80 ml

Disolver el cristal violeta en el alcohol y el oxalato de amonio en el agua destilada, Mezclar las dos soluciones.

**LUGOL**

Yodo sublimado	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	300 ml

Triturar el yodo y el yoduro de potasio en un mortero agregar poco a poco pequeñas cantidades de agua y completar el volumen a 300 ml.

**SOLUCION DE SAFRANINA**

Safranina O	0.25 g
Alcohol etílico	10 ml
Agua destilada	90 ml

Disolver la safranina en el alcohol y mezclar con agua destilada.

**ALFA NAFTIL AMINA**

Dimetil-alfa-naftil-amina	6.0 g
Acido acético (5N)	1000 ml

Disolver con ligero calentamiento.

**ACIDO SULFANILICO**

Acido sulfanílico	8.0 g
-------------------	-------

Acido acético	1000 ml
---------------	---------

Disolver con ligero calentamiento.

**ALCOHOL ACIDO**

Alcohol etílico al 95 por ciento	97 ml
HCl (concentrado)	3 ml

**SOLUCION COLORANTE DE CARBOL-FUCSINA DE ZIEHL NEELSEN**

Fucsina básica	0.3 g
Alcohol etílico al 95 por ciento	100 ml

Mezclar lo siguiente:

Fenol (cristales fundidos en baño María a 56° C Usar pipeta con bulco de goma)	5 ml
Agua destilada	95 ml

**MORDIENTE PARA FLAGELOS**

Alumbre potásico (solución acuosa saturada)	5 ml
Acido tánico (solución acuosa al 20 por ciento)	2 ml
Cloruro de mercurio (solución saturada)	2 ml

Mezclar y agregar 0.4 ml de una solución alcoholica saturada de fucsina básica. Preparar antes de usarse.

**SOLUCION COLORANTE DE BORAX-AZUL DE METILENO**

Azul de metileno	0.1 g
Borax	1.0 g
Agua	100 ml