

## 7.7: Metabolismo de hidratos de carbono

---

### Utilización de glucosa (OF-glucosa)

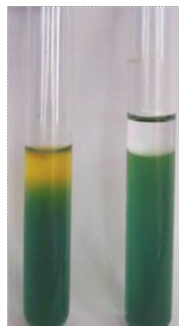
*Fundamento:* Los microorganismos degradan la glucosa fermentativa u oxidativamente. Los productos de la fermentación son una mezcla de ácidos relativamente fuertes que pueden ser detectados en una prueba convencional de fermentación. Sin embargo, los ácidos formados en la degradación oxidativa de la glucosa son extremadamente débiles y por consiguiente se requiere un medio más sensible para su detección, como es el medio **O/F glucosa** (peptona 2 g, glucosa 10 g, azul de bromotimol 0,03 g, NaCl 5 g, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H 0,3 g, agar 2,5 g, agua destilada 1000 ml, pH 6,8).

- El medio O/F presenta las siguientes características:
- La concentración de peptonas es considerablemente más baja, 0,2%
- La concentración de hidratos de carbono es más alta, 1%
- La concentración de agar es del 0,2 al 0,3% dándole una consistencia semisólida

La menor proporción de peptona con respecto a la de carbohidratos reduce la formación de aminas alcalinas que podrían neutralizar las pequeñas cantidades de ácidos débiles que se forman como consecuencia del metabolismo oxidativo. La cantidad relativamente mayor de carbohidratos sirve para incrementar la cantidad de ácido que potencialmente se pueda formar, mientras que la consistencia semisólida del agar permite que los ácidos que se forman sobre la superficie del agar difundan a través del medio haciendo la interpretación del cambio de pH del indicador de más fácil visualización.

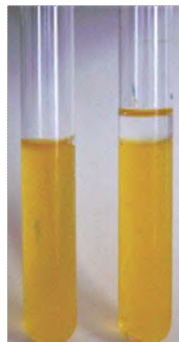
*Procedimiento:* A partir del caldo tripticasa soya con desarrollo bacteriano, sembrar en picadura en el medio de **OF-glucosa**, por duplicado. Agregar vaselina estéril líquida a uno de los tubos para favorecer la fermentación del azúcar. Incubar a 37° C durante 48 h.

*Interpretación:* La producción de ácido en el medio se detecta por el viraje del color verde inicial a amarillo intenso. El agregado de vaselina crea la anaerobiosis necesaria para la fermentación.



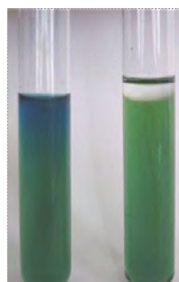
Tubo sin vaselina: ácido (amarillo)  
Tubo con vaselina: alcalino (verde)

**Metabolismo:** oxidativo



Tubo sin vaselina: ácido (amarillo)  
Tubo con vaselina: ácido (amarillo)

**Metabolismo:** fermentativo



Tubo sin vaselina: alcalino (verde)  
Tubo con vaselina: alcalino (verde)

**Metabolismo:** no sacarófilo

Figura 7.7.1: (CC-BY; Este libero)

## Prueba del rojo de metilo

*Fundamento:* La prueba del rojo de metilo detecta la producción de ácido (láctico, acético, fórmico, succínico) como consecuencia de la degradación de la glucosa por la vía de la fermentación ácido mixta. Dicha prueba se basa en el uso de un indicador de pH, el rojo de metilo, que presenta un rango de viraje entre 6 (amarillo) y 4,4 (rojo). Los microorganismos que realizan fermentación ácida mixta a partir de glucosa producen un descenso de pH por debajo de 4,5, lo que hace virar el indicador de pH rojo de metilo de amarillo a rojo.

El medio utilizado es CALDO GLUCOSA FOSFATO (caldo MR/VP o Clark y Lubs) que se utiliza también para la prueba de Voges- Proskawer. Su composición es la siguiente: peptona 5 g; glucosa 5 g; fosfato monobásico 5 g; agua destilada 1000 ml; pH ~ 7.

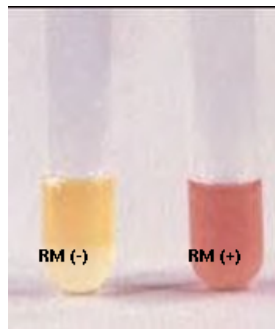


Figura 7.7.2: (CC-BY; Este libreo)

*Procedimiento:* Se inocula el medio con la cepa bacteriana y se incuba a 37° C durante 48 h. Luego del período de incubación se agregan 2 ó 3 gotas de rojo de metilo directamente al medio.

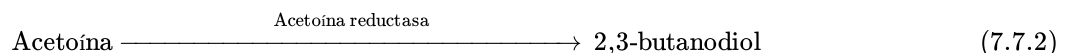
*Interpretación:* El desarrollo de un color rojo estable en el medio es indicativo de suficiente producción de ácido para mantener el pH a 4,4 o menos, y es una reacción (+), mientras que en la reacción (-) el color es amarillo-naranja.

### Prueba de voges-proskawer

*Fundamento:* Esta prueba se basa en la detección de acetilmetilcarbinol (**acetoína**), un producto final neutro derivado del catabolismo de la glucosa llevado a cabo por determinadas bacterias.

El ácido pirúvico, el compuesto clave formado en la degradación de la glucosa, es metabolizado posteriormente por diversas vías dependiendo de los sistemas enzimáticos que posean las diferentes bacterias. Una de tales vías es la que produce como metabolito final, el 2,3-butanodiol (fermentación butilenglicólica). La acetoína es el precursor del 2,3-butanodiol:

La producción de 2,3-butanodiol causa un incremento de la producción de CO<sub>2</sub>, originándose menos ácidos y acumulándose acetoína. El equilibrio entre acetoína y 2,3-butanodiol está determinado por la cantidad de H<sub>2</sub> disponible.



En presencia de O<sub>2</sub> y álcali, tanto la acetoína como el 2,3-butanodiol son oxidados a diacetilo, que es el compuesto que reacciona para dar el color en esta prueba. La secuencia de reacciones es la siguiente:

*Procedimiento:* Sembrar la cepa bacteriana en el CALDO GLUCOSA FOSFATO (caldo MR/VP o Clark y Lubs), incubar a 37° C durante 24 h. Luego del período de incubación se agregan 0.6 ml de reactivo a-naftol al 5% en etanol absoluto y 0.2 ml KOH al 40% en agua destilada. Agitar bien luego de agregar cada reactivo e inclinar el tubo para favorecer la aireación y dejar el tubo en reposo durante 10 – 15 minutos.

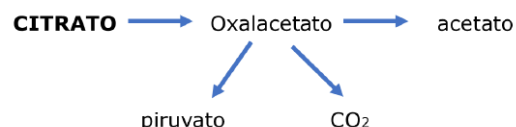
*Interpretación:* Reacción (+): color rosa después de los 15 min de la adición de los reactivos. La aparición de color se inicia en la parte superior del tubo y la lectura no debe hacerse después de 1 hora.

Reacción (-): sin cambios.

### Citrato de simmons

*Fundamento:* El citrato sódico es una sal del ácido cítrico, compuesto orgánico sencillo encontrado como uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs). Algunas bacterias pueden obtener energía utilizando el citrato como única fuente de carbono. En las bacterias, la degradación de citrato implica a un sistema enzimático sin la participación de la coenzima A, dicha enzima es la citrato oxalacetato-lias, la cual requiere la presencia de un catión divalente para su actividad, generalmente Mg o Mn.

La degradación del citrato se produce de la siguiente forma:



Los productos obtenidos del metabolismo del citrato dependerán del pH del medio. A pH alcalino no hay producción de lactato y los productos son: **CO<sub>2</sub>, ácido fórmico y ácido acético**. A pH ácido, **acetil metilcarbinol y lactato** son los productos principales que se forman en la degradación del citrato.

La utilización de citrato por una cepa bacteriana se detecta en medio con citrato, desprovisto de proteínas y de hidratos de carbono, por la producción de subproductos alcalinos. El medio incluye citrato sódico como única fuente de carbono y fosfato monoamónico como única fuente de nitrógeno.

Las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden utilizar sales inorgánicas amónicas como fuente de nitrógeno, con la producción de iones amonio, que conduce a la alcalinización del medio por la conversión del NH<sup>+</sup> a hidróxido amónico. Se utiliza un indicador de pH como el azul de bromotimol, que es amarillo a pH inferior a 6 y azul a un pH superior a 7.6.

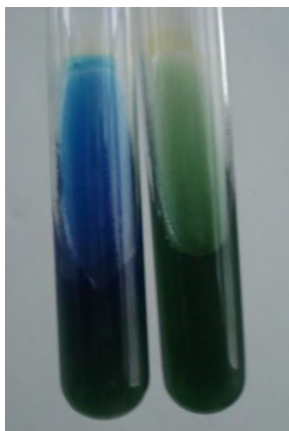


Figura 7.7.3: (CC-BY; Este libero)

*Procedimiento:* Inocular el medio Citrato (inclinado) con la cepa bacteriana, incubar a 37° C durante 24 – 48 h. Observar e interpretar los cambios producidos en el medio.

*Interpretación:*

Reacción (+): crecimiento bacteriano y viraje a azul en el pico.

Reacción (-): no se observa desarrollo y el medio permanece verde.

### Prueba de tsi (Three Sugar Iron)

*Fundamento:* La composición de este medio de cultivo es la siguiente: Lactosa (1%), Sacarosa (1%), Glucosa (0,1%), tiosulfato sódico, sulfato ferroso, rojo de fenol (indicador de pH), peptona, extracto de levadura y extracto de carne, lo que lo hace un medio muy rico desde el punto de vista nutricional.

En el medio TSI se obtiene la siguiente información fisiológica:

**Fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa.** El medio contiene una pequeña cantidad de glucosa y una gran cantidad de lactosa y sacarosa. Los microorganismos capaces de fermentar cualquiera de estos compuestos darán lugar a la formación de ácidos que bajan el pH del medio, como consecuencia, el rojo fenol vira a amarillo.

La sucesión de eventos metabólicos es la siguiente:

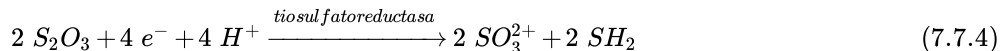
1. El microorganismo utiliza la fuente de carbono más asequible en el medio, la **glucosa**. Pero como se encuentra en el medio en muy baja concentración se agota rápidamente. Los productos de su degradación acidifican el medio que cambia de rojo a amarillo.
2. Al agotarse la glucosa empieza a utilizar las **peptonas**, pero solamente en **aerobiosis** (se corresponde a la zona inclinada del tubo). Este consumo da lugar a residuos amoniacales, produciendo una alcalinización del medio. El indicador vira a rojo en esta parte del tubo.
3. Posteriormente se produce el consumo de **lactosa/sacarosa**, en el caso de los microorganismos que sean capaces de utilizar los disacáridos. Esto da lugar a un **descenso de pH** por lo que cambiará el medio de rojo a amarillo. La razón de que la lactosa y sacarosa se utilicen después es debido a que se trata de enzimas **inducibles**, lo que significa que existe un periodo de latencia entre el agotamiento de la glucosa y la producción de las primeras moléculas de β-galactosidasa, de tal forma que después de un tiempo de consumo de peptonas se comienza a utilizar lactosa/sacarosa.

**Producción de gas.** La producción de gas se detecta por la formación en el medio de burbujas de gas perfectamente visibles ya que rompen el medio. El gas se origina mediante la reacción catalizada por la **formiato liasa** a partir de ácido fórmico:



Por tanto, son “gas (+)” aquellos microorganismos que produzcan esta enzima.

**Producción de SH<sub>2</sub>.** Algunas bacterias son capaces de llevar a cabo la siguiente reacción a partir del tiosulfato añadido al medio:



El ácido sulfhídrico se detecta porque reacciona con las sales de metales pesados (Fe<sup>2+</sup>) presentes en el medio. Esto da lugar a la formación de **sulfuro de hierro** que se deposita en gran parte del tubo, sobre todo en el fondo, oscureciendo el medio.

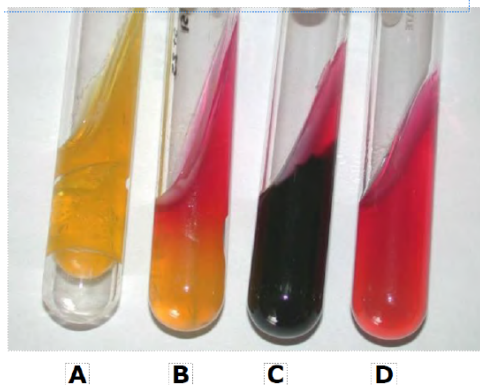


Figura 7.7.4: (CC-BY; Este libero)

**Procedimiento:** Inocular la cepa bacteriana en un tubo de medio TSI (agar pico de flauta) con el ansa de siembra. La siembra se hará de la siguiente manera: sembrar **la superficie por estría** y sembrar **la parte interna del medio por picadura** (es necesario pinchar suficientemente, sobre todo para la detección de producción de sulfhídrico). Incubar 18 – 24 h a 37° C. Observar e interpretar los cambios producidos en el medio.

**Interpretación:**

*Parte inclinada y parte profunda amarilla:* fermentación de los tres azúcares (A)

*Agar fragmentado:* producción de gas (CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>) (A)

*Parte inclinada roja y parte profunda amarilla:* fermentación de la glucosa (B) (C)

*Precipitado negro:* formación de sulfhídrico (C)

*Parte inclinada roja y parte profunda “sin cambio”:* fermentación de glucosa (D)

This page titled [7.7: Metabolismo de hidratos de carbono](#) is shared under a [not declared](#) license and was authored, remixed, and/or curated by [María M. Reynoso, Carina E. Magnoli, Germán G. Barros y Mirta S. Demo](#).