

Metabolismo de proteínas

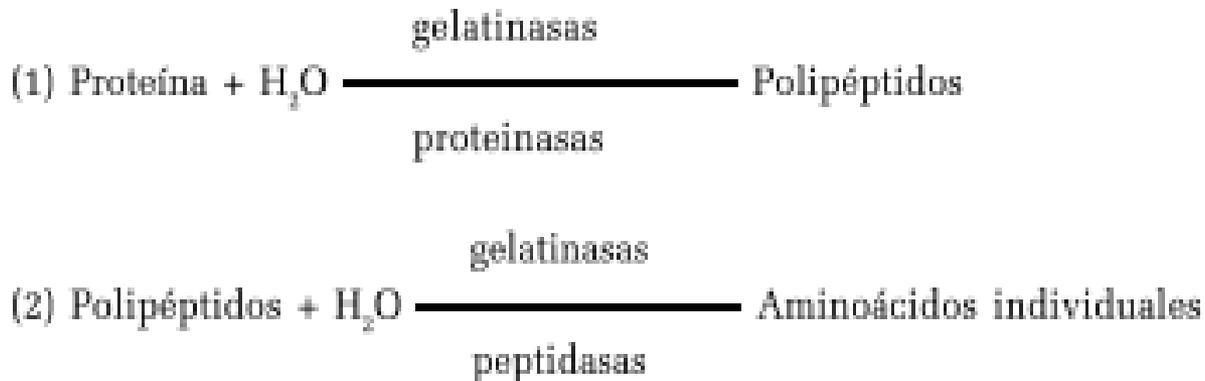
- ❖ Los microorganismos también tienen la capacidad de utilizar proteínas y los productos resultantes de esos procesos a su vez nos ayudan en la identificación de los mismos.
- ❖ Las proteínas son moléculas demasiado grandes para atravesar sin ayuda las membranas citoplasmáticas, por lo cual los microorganismos sintetizan *proteasas* y *peptidasas* extracelulares que rompen las proteínas hasta aminoácidos, que sí pueden atravesar la membrana.
- ❖ Sin embargo, antes que los aminoácidos sean catabolizados deben ser convertidos en sustancias que puedan entrar al ciclo de Krebs.
- ❖ Durante tales conversiones, llamadas **desaminaciones**, el grupo amino del aminoácido es separado y convertido en un ion amonio (NH₄⁺) que puede ser excretado por la célula. El ácido orgánico resultante entra en el ciclo de Krebs.
- ❖ Otras transformaciones implican la **descarboxilación** (eliminación de grupos COOH) y **deshidrogenación**.

Entre las pruebas que permiten evaluar la utilización de las proteínas tenemos:

- a) Hidrólisis de la gelatina.
- b) Descarboxilación y deaminación de aminoácidos (LIA, MIO, fenilalanina).
- c) Producción de indol.
- d) Hidrólisis de la urea.

a) Hidrólisis de la gelatina

La gelatina, una proteína derivada del colágeno animal, se incorpora a diferentes medios de cultivo para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas proteolíticas (proteinasas) detectadas por digestión o licuefacción de la gelatina. A estas enzimas se les denomina gelatinasas y a menudo son importantes factores de virulencia de algunos microorganismos. El catabolismo de las proteínas por parte de las gelatinasas es un proceso de dos pasos; el resultado final es una mezcla de aminoácidos aislados.



La gelatina es hidrolizada por la gelatinasa en sus aminoácidos constitutivos, con pérdida de sus características gelificantes.

Básicamente hay cinco métodos para su detección, uno de los más utilizados es el medio de gelatina nutriente en placa, en este medio, si el microorganismo ha producido la enzima, se va a observar una precipitación de color blanco lechoso lo cual representa una reacción positiva

Hidrólisis de la gelatina (medio de gelatina nutriente en placa)



b) Descarboxilación y deaminación de aminoácidos:

- **Utilidad de la prueba:** sobre todo para determinar grupos bacterianos entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

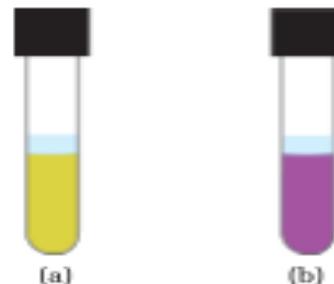
- **Fundamento:** La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas atacan a los aminoácidos en su carboxilo terminal (COOH) para formar una amina o una diamina y dióxido de carbono. Existen numerosas enzimas descarboxilasas, cada una, específica para un sustrato dado. En un laboratorio de bacteriología

Para evaluar esta característica bacteriana, se han descrito ciertos sistemas de prueba basados en la detección de una desviación alcalina del pH en el medio de prueba. Existen diferentes medios que se utilizan para evaluar la actividad descarboxilasa de los microorganismos; entre ellos, tenemos:

Caldo Möller:

Contiene como ingredientes importantes el indicador de pH **púrpura de bromocresol** (amarillo-verdoso a pH ácido y púrpura a pH alcalino), glucosa y peptona. El aminoácido a evaluar se añade al medio base antes de inocular a la bacteria. De manera paralela, debe disponerse de un tubo control que consiste en el medio base sin el aminoácido. Ambos tubos se incuban en anaerobiosis (cubiertos con una capa de parafina líquida). Luego de la inoculación del microorganismo, en la etapa inicial de incubación habrá producción de ácidos mixtos haciendo que el indicador de pH vire a amarillo, si la bacteria tiene la enzima (ésta se inducirá gracias al medio ácido existente) el aminoácido será descarboxilado alcalinizando el medio y como consecuencia habrá viraje del indicador a púrpura

Caldo Möller.



(a) Tubo control. (b) Tubo con aminoácido.

Agar lisina hierro (LIA):

Tiene la ventaja de que permite, además, detectar la deaminación de la lisina, característica esta útil para identificar géneros como: *Proteus*, *Morganella* y *Providencia*. Las deaminasas también son enzimas inducidas por el pH del medio, en este caso, el medio alcalino. El LIA al igual que el KIA tiene dos cámaras de reacción: el bisel, en el cual se lee la desaminación de la lisina, y el taco, en el cual se lee la descarboxilación del aminoácido.



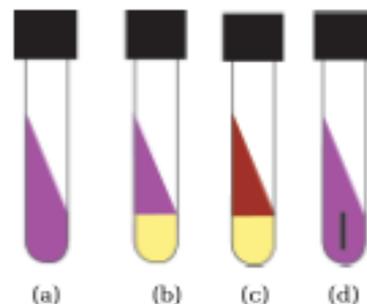
1. Descarboxilación de la lisina: el microorganismo utiliza la glucosa presente en el medio produciéndose ácidos mixtos que disminuyen el pH del medio provocando el viraje del indicador púrpura de bromocresol a amarillo; esta acidez induce la producción de la enzima lisina descarboxilasa, dando lugar a la formación de aminas llamadas cadaverina que alcalinizan el medio, lo que resulta en un viraje del indicador de pH nuevamente a púrpura, lo cual indica una reacción positiva. En el bisel, por la utilización de las peptonas, se originan aminas que alcalinizan el medio dando lugar al viraje del indicador a púrpura, lo cual se interpreta como una reacción negativa para la producción de la enzima desaminasa. (Fig. 28a).

2. Ausencia de descarbo lisina: al producirse ácidos mixtos por la utilización de la glucosa, disminuye el pH del medio provocando el viraje del indicador púrpura de bromocresol a amarillo, como el microorganismo no produce la enzima lisina descarboxilasa, el medio permanecerá amarillo (taco), lo cual indica una reacción negativa para la descarboxilación. El microorganismo al utilizar las peptonas en el bisel origina aminas dando lugar al viraje del indicador a púrpura, lo cual se interpreta como una reacción negativa para la producción de la enzima desaminasa (Fig. 28b).

3. Deaminación de la lisina: el microorganismo al utilizar las peptonas produce una alcalinización que es el estímulo para inducir la producción de la enzima lisina desaminasa la cual actúa sobre el aminoácido dando lugar a la formación de un cetoácido (ácido α -ketocarboxílico) que reacciona con la sal férrica en presencia de oxígeno y produce un color rojo vino en el bisel, lo cual indica que el microorganismo desaminó la lisina. El extremo inferior se observa amarillo, debido a la fermentación de la glucosa.

d) Producción de H_2S : en este medio se observa producción de ácido sulfhídrico gracias al tiosulfato de sodio que utiliza como fuente de azufre aquellos microorganismos productores de H_2S , el cual se evidencia gracias al citrato de amonio férrico contenido también en el medio, que al reaccionar con el H_2S forma un precipitado negro insoluble (sulfuro ferroso).

Reacciones en el LIA.



(a) Descarboxilación de la lisina positiva. (b) Descarboxilación de la lisina negativa.
(c) Desaminación de la lisina positiva. (d) Descarboxilación de la lisina y producción de H_2S .

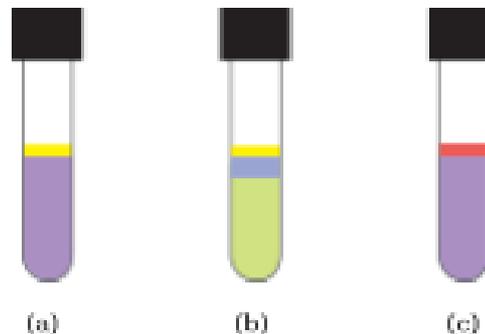
Medio motilidad-indol-ornitina (MIO):

Es un medio semisólido (Anexo 13) que permite observar además de la descarboxilación de la ornitina en el fondo del tubo, la motilidad (turbidez del medio) y la producción de indol al agregar el reactivo de Kovacs; características importantes para la identificación de las enterobacterias. El fundamento en relación con la descarboxilación de la ornitina es con el mismo principio de la prueba anterior. El producto amino específico de la ornitina es la putrescina. La observación de un color púrpura en el fondo del tubo indica una reacción positiva para la descarboxilación de la ornitina (Fig.29a). En caso de no producirse descarboxilación se observa un viraje del indicador a amarillo por la degradación de la glucosa en el fondo del tubo (Fig. 29b).

Los organismos móviles muestran un crecimiento difuso o turbidez extendido en el agar a lo largo de la línea de inoculación. Los organismos inmóviles crecen sólo a lo largo de la línea de inoculación.

La producción de indol es dependiente de la presencia de un grupo triptófano en el medio. El indol se forma desde el triptófano por acción de la enzima triptofanasa y reacciona con el aldehído del reactivo de Kovacs para formar un anillo color fucsia (Fig. 29c).

Reacciones en el MIO.



(a) Descarboxilación de la ornitina positiva e indol negativo. (b) Descarboxilación de la ornitina e indol negativos. (c) Descarboxilación de la ornitina positiva e indol positivo.

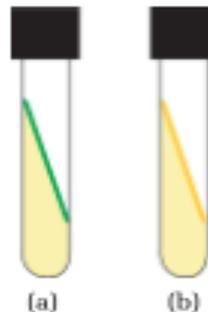
Producción de fenilalanina deaminasa:

- **Utilidad de la prueba:** se utiliza para separar los géneros *Proteus* y *Providencia* de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

- **Fundamento:** La fenilalanina es un aminoácido que puede ser deaminado de forma oxidativa por algunas bacterias debido a su capacidad para producir la enzima fenilalanina desaminasa con producción de un cetoácido llamado ácido fenilpirúvico, el cual se detecta al añadir una solución de cloruro férrico al 10% (FeCl_3) desarrollándose un color verde por la

quelación entre ambos compuestos, lo que indica una reacción positiva, mientras que si el microorganismo no es capaz de desaminar el aminoácido el FeCl_3 permanece de su color original (amarillo ocre). En la figura 30 se muestran las reacciones positiva (a) y negativa (b).

Agar fenilalanina.



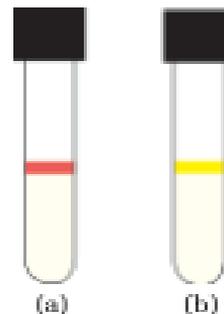
(a) Desaminación positiva. (b) Desaminación negativa.

c) Producción de Indol

• **Utilidad de la prueba:** Ayuda a la diferenciación entre géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae*, especies de anaerobios de los géneros *Porphyromonas* y *Prevotella*; junto con otras pruebas, subdivide en biotipos a *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus parainfluenzae*.

• **Fundamento:** El indol, un benzilpirrol, es uno de los productos de la degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y deaminar el triptófano con la producción de indol, ácido pirúvico y amonio. Esta prueba está basada en la formación de un complejo color fucsia cuando el indol reacciona con el grupo aldehído de p-dimetilaminobenzaldehído (Fig. 31). Esta es la sustancia química activa en las soluciones más utilizadas como el reactivo de Kovacs (alcohol amílico + p-dimetilaminobenzaldehído) y el reactivo de Ehrlich (alcohol etílico + p-dimetilbenzaldehído), este último es más sensible, se sugiere en anaerobios y bacilos no fermentadores cuya producción de indol es mínima. Debe usarse un medio rico en triptófano (Anexo 14).

FIGURA 31**Caldo triptófano.**



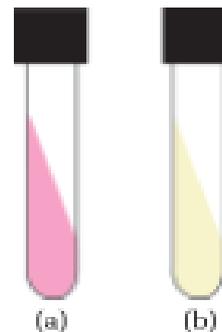
(a) Indol positivo. (b) Indol negativo.

d) Hidrólisis de la urea

• **Utilidad de la prueba:** Para diferenciar especies de *Proteus* de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, ayuda a la diferenciación de especies de los géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Mycoplasma*, entre otros; detección de *Helicobacter pylori*.

• **Fundamento:** La urea es una diamida del ácido carbónico; todas las amidas son fácilmente hidrolizadas con la liberación de amoníaco y dióxido de carbono. La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos, los cuales pueden hidrolizar la urea liberando amoníaco. El amoníaco reacciona con la solución para formar carbonato de amonio, resultando en la alcalinización y aumento del pH del medio. Esta reacción es detectada por el indicador rojo de fenol el cual es de color fucsia a pH alcalino. El caldo de urea de Stuart y el agar urea de Christensen (Anexo 15) son los dos medios más utilizados en laboratorios clínicos para la detección de la actividad de la ureasa. Este último es un medio sólido inclinado, el cual se inocula por estría y después de una incubación de 24 h, el color fucsia a través del medio indica la alcalinización del mismo y por consiguiente la hidrólisis de la urea (Fig. 32a). Cuando no hay hidrólisis, el medio permanece con su color original

Agar urea.



(a) Reacción positiva. (b) Reacción negativa.