

Flora del tracto gastrointestinal

Objetivos

1. Aprender sobre la flora microbiana asociada al área rectal y del intestino grueso.
2. Aislar bacterias asociadas al recto.
3. Repasar sobre pruebas usadas para la identificación de bacterias de la familia Enterobacteriaceae.

I. Flora del tracto gastrointestinal

El sistema digestivo (tracto digestivo) es el tracto que se extiende desde la boca hasta el recto. Este consiste de diversos órganos como la boca, faringe, esófago, estómago e intestinos. También hay otros órganos que los apoya como son el páncreas, vesícula y hígado. La función del tracto digestivo son: 1) mover la comida, 2) secretar sustancias, 3) digestión, 4) absorción y 5) eliminación.

La microbiota del tracto digestivo tiene varias funciones fisiológicas en nuestro cuerpo como es fortalece el intestino formando parte del epitelio, degradación de la comida y protección contra patógenos. Ayuda a mantener la integridad de la mucosa, provee vitaminas que nuestro cuerpo no puede sintetizar y a la función del sistema inmunológico. La composición de la microbiota en este lugar puede estar afectada por factores ambientales de la zona, la dieta y la genética del hospedero. Se cree que la microbiota del tracto digestivo se comienza a establecer desde el nacimiento del hospedero y se va modificando según pasa los años de vida del hospedero. Ya para la adultez, la microbiota es estable con episodios de fluctuaciones en su composición por eventos que le ocurre al hospedero.

A este sistema entra microorganismos de los cuales poco se establecen por los mecanismos de defensa que tiene nuestro cuerpo. Sobre la microbiota de la cavidad bucal y garganta fue discutida anteriormente y forma parte del tracto digestivo superior. En este laboratorio nos enfocaremos en el tracto digestivo inferior que incluye el intestino y ano. Las dos terceras partes del intestino delgado tienen una microbiota que mayormente son lactobacilos y estreptococos. En cambio la otra tercera parte del intestino se compone de bacterias Gram negativas anaerobias facultativas como es la familia Enterobacteriaceae y bacterias anaerobias obligadas como son *Bacteroides* spp. y *Clostridium* spp. Por otro lado, en el intestino grueso predomina *Bacteroides* y puede conseguirse *Prevotella* y *Ruminococcus*, que son bacterias anaerobias obligadas. Aunque cuando se realiza examen de muestras de heces fecales, se consigue miembros de la familia Enterobacteriaceae como es *E. coli* en gran número.

La familia Enterobacteriaceae forma parte del filo Proteobacteria bajo la clase Gammaproteobacteria y el orden Enterobacteriales. Esta familia también es conocida como bacterias entéricas y consiste de bacterias Gram negativas, aeróbicas facultativas no formadoras de esporas, fermentadoras de azúcares, oxidasa negativas que tienden hacer motiles como no motiles. La familia Enterobacteriaceae es una amplia que incluye bacterias de la flora normal de animales como patógenos de plantas y animales. Muchas bacterias de esta familia son han sido estudiadas por su importancia médica. Ejemplo de estas son *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus* y *Klebsiella*. El género *Escherichia* tiene especies que son parte de la flora gastrointestinal como especies patógenas. *Salmonella* es usualmente patógena y tiene especies que son parte de la flora gastrointestinal de reptiles. Este género nos ocasiona fiebre tifoidea y gastroenteritis. *Shigella* es patógena en humanos y puede causar gastroenteritis. *Proteus* se puede aislar de tracto urinario del humano. El género *Klebsiella* tiene la bacteria *K. pneumoniae* que nos causa neumonía y algunas de sus especies se pueden encontrar en suelo y agua. Par

aislar esta familia de bacterias se usa muchas veces medio selectivo y diferencial como es agar de MacConkey. Este medio contiene cristal violeta que inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas. La azúcar lactosa que permite ver si la bacteria entérica aislada sea fermentadora de lactosa. Y contiene el indicador de cambio de pH, rojo neutral. En este medio se ve cambio de color en la colonia y no en el medio de cultivo como ocurre en “Mannitol Salt Agar”. Por ejemplo, *E. coli* fermenta lactosa y crece como colonia roja a rosada intenso en este MacConkey. *Klebsiella* crece rosada con una consistencia mucóide y *Enterobacter* crece rosada pero no mucóide. *Citrobacter*, *Serratia*, *Providencia* y *Hafnia* crece incolora en las primeras 24 horas de incubación y pueden tomar un tono rosado luego de las 24 horas. *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* crece incoloras en MacConkey.

Práctica:

A. Aislar bacterias del tracto gastrointestinal

1. MacConkey Agar

1. Limpie el área de trabajo con desinfectante y lleve a cabo las técnicas asépticas aprendidas en microbiología general.
2. Rotule el anverso del plato Petri de MacConkey con iniciales, fecha, Biol 4375L sección. Divida el plato en 4 zonas para poder inocular a través de un estriado de 4 cuadrantes.
3. Frote un el área perianal del cuerpo con un hisopo estéril humedecido con amortiguador.
4. Inocule en el primer cuadrante con el hisopo en el baño. Coloque el hisopo en su envoltura y descarte en el zafacón del baño. Traiga el plato Petri y el tubo con amortiguador al laboratorio para continuar la práctica.
5. Luego esparza el restante de la muestra desde el primer cuadrante a los demás usando una aguja de inocular y llevando a cabo la técnica de estriado en 4 cuadrantes.
6. Coloque parafina al plato e incuba a 37°C por 24-48 horas hasta que vea crecimiento bacteriano para aislar.
7. Anote las observaciones de apariencia de las colonias, color de las mismas y tome fotos del plato.
8. Luego, seleccione una colonia, favorablemente que sea color fusha-rosada, y aísle en un tubo inclinado de “Tryptic Soy Agar” (TSA). Guarde el plato de MacConkey en la nevera e incubar el tubo a 37°C por 24-48 horas. Guarde el tubo de TSA en la nevera luego de observar bastante crecimiento del desconocido.

B. Pruebas para identificar el desconocido que se realizará en el próximo laboratorio. (IMViC)

1. **Tinción Gram:** ya discutida y practicada en el primer laboratorio. Seguir las instrucciones de esa separata.
2. **SIM:** Este medio se usa para observar si la bacteria tiene motilidad, produce ácido sulfhídrico (H₂S) e indol. El medio se torna oscuro por la producción y precipitación de H₂S. Se torna rosado en la superficie del medio al añadir el reactivo de Kovac indicativo de producción de indol. La motilidad se observa al ver crecimiento como un tornado luego de haberse inoculado la bacteria en estocado.
 - a. Rotule el tubo con iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
 - b. Inocule en forma de estocado la bacteria usando una aguja de inocular recta. Recuerde llevar a cabo las técnicas asépticas.
 - c. Incubar por a 37°C por 24-48 horas y anote observaciones de cambio de color y crecimiento de la bacteria en el medio en su libreta.

- d. Añadir unas gotas del reactivo de Kovac y mover ligeramente el tubo. Verificar si se torna rojo (+) o amarillo (-). Tome foto.
- e. Descarte el tubo en la gradilla para descartar luego de haber removido la cinta adhesiva del tubo.

3. MR-VP (rojo de metilo y Voges-Proskauer):

La **prueba de rojo de metilo (MR)** permite ver si la bacteria oxida glucosa produciendo ácido. Le medio es líquido y contiene glucosa como fuente de carbono, rojo de metilo como indicador de cambios de pH bajo como es pH 4. Si se observa un cambio de color a rojo después de añadir el indicador rojo de metilo esto se puede interpretar en que el medio está a pH 4 a causa de la fermentación de la glucosa por la bacteria. Si se torna amarillo al añadir el indicador se interpreta que hay presencia de ácido pero no a alta concentración y está a pH 6. Esto sería un resultado negativo para esta prueba. La prueba se puede incubar por 48 horas pero para bacterias lentas en fermentación debe incubarse por 4-5 días.

- a. Rotule el tubo con iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
- b. Inocule en forma la bacteria usando una aguja de inocular "loop". Recuerde llevar a cabo las técnicas asépticas.
- c. Incubar por a 37°C por 4-5 días.
- d. Añadir 5 gotas del reactivo rojo de metilo y mover ligeramente el tubo. Verificar si se torna rojo (+) o amarillo (-). Tome foto.
- e. Anote observaciones de cambio de color en el medio en su libreta.
- f. Descarte el tubo en la gradilla para descartar luego de haber removido la cinta adhesiva del tubo.

La **prueba de Voges-Proskauer (VP)** ayuda a determinar si la bacteria puede producir compuesto no aciditos después de una fermentación de glucosa ya que tiene enzimas que convierte el ácido de la fermentación en otros componentes como es el 2,3-butanediol. A la prueba se le añade el reactivo de Barrit que es KOH 40% y alfa-naftol 5% para detectar el precursor del 2,3-butanediol que es acetoina. Una prueba positiva es cuando el medio se torna rojo luego de añadirle los reactivos. Para esta prueba hay que esperar aproximadamente 15-20 minutos luego de añadir los reactivos para ver si es positiva. Si no se torna rojo quiere decir que es una prueba negativa.

- a. Rotule el tubo con iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
- b. Inocule en forma la bacteria usando una aguja de inocular "loop". Recuerde llevar a cabo las técnicas asépticas.
- c. Incubar por a 37°C por 24-48 horas.
- d. Añadir 10 gotas de alfa-naftol y 5 gotas de KOH 40%. Mover ligeramente el tubo. Esperar 15-20 minutos si ocurre la reacción y cambio de color. Verificar si se torna rojo (+). Tome foto.
- e. Anote observaciones en el medio en su libreta.
- f. Descarte el tubo en la gradilla para descartar luego de haber removido la cinta adhesiva del tubo.

4. Citrato: En esta prueba se corrobora si la bacteria tiene usar citrato como fuente de carbono y si tiene la capacidad de transportar el citrato hacia su interior. Ya dentro de la bacteria, la misma puede convertirlo en ácido pirúvico y CO₂. Este medio contiene citrato como fuente de carbono, NH₄ como fuente de nitrógeno, cloruro de sodio (NaCl) y el indicador azul de bromotimol. El medio es servido en agar inclinado para

mejor disponibilidad de oxígeno para el uso de citrato. El CO₂ producido por la degradación de citrato reacciona con el sodio (Na) disponible en el medio y forma carbonato de sodio (Na₂CO₃) que sube el pH (alcaliniza) haciendo que el indicador cambie de verde a azul.

- a. Rotule el tubo con iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
 - b. Inocule en forma de zig-zag la bacteria usando una aguja de inocular “loop”. Recuerde llevar a cabo las técnicas asépticas.
 - c. Incubar por a 37°C por 24-48 horas.
 - d. Observe si hay cambio de color del medio de verde a azul. Tome foto.
 - e. Anote observaciones en el medio en su libreta.
 - f. Descarte el tubo en la gradilla para descartar luego de haber removido la cinta adhesiva del tubo.
5. **Triple Sugar Iron Agar (TSIA):** A través de este medio se puede observar si la bacteria utiliza las azúcares: glucosa, lactosa y sacarosa y produce sulfitos. La razón de las azúcares está: 1% lactosa, 1% sacarosa y 0.1% glucosa. El medio tiene rojo fenol como indicador de cambios de pH para detectar la producción de ácido por la fermentación de las azúcares. Esta prueba se inocula con la aguja recta haciendo un zig-zag en la parte inclinada del agar y un estocado hasta el fondo del tubo. Se puede observar varios patrones de color a causa de la fermentación, formación de gas agrietándose el medio y producción de H₂S que hace que el medio se torne negro en el fondo.
- a. Rotule el tubo con iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
 - b. Inocule en forma de zig-zag la bacteria usando una aguja recta y luego un estocado hasta el fondo del tubo. Recuerde llevar a cabo las técnicas asépticas.
 - c. Incubar por a 37°C por 24 horas.
 - d. Observe si hay cambio de color del medio. Tome foto y anote observaciones de los patrones de cambio de color en su libreta. Croorbore si el medio se agrieto por formación de gas y si se tornó negro en el fondo por la producción de H₂S.
 - e. Descarte el tubo en la gradilla para descartar luego de haber removido la cinta adhesiva del tubo.
6. **Fermentación de glucosa:** Permite observar si la bacteria tiene la capacidad de utilizar la glucosa a través de la fermentación. A través de la fermentación el organismo puede producir alcoholes, gas, ácidos y otras moléculas. Cuando se fermenta glucosa se produce ácidos que bajan el pH del medio. Este medio está hecho con la base de rojo fenol que es el indicador de cambios de pH y cambia de rojo a amarillo por la baja en pH. El medio es líquido y tiene un pequeño tubo invertido conocido como el tubo Durham que permite atrapar gas si es producido a través de la fermentación. La prueba es positiva a fermentación ácida si cambia de color rojo a amarillo. Si el medio se torna más rojo es que la bacteria lleva a cabo una fermentación alcohólica siendo un resultado negativo para la prueba.
- a. Rotule el tubo con iniciales, fecha, Biol 4375L sección.
 - b. Inocule la bacteria usando una aguja de inocular “loop”. Recuerde llevar a cabo las técnicas asépticas.
 - c. Incubar por a 37°C por 24-48 horas.

- d. Observe si hay cambio de color del medio a amarillo y si se a trapa burbujas en el tubo Durham. Tome foto.
- e. Anote observaciones en el medio en su libreta.
- f. Descarte el tubo en la gradilla para descartar luego de haber removido la cinta adhesiva del tubo.

Algunas pruebas para identificar

Organismos	TSIA	H2S	Citrato	MR	VP	H2S	Indole	Motilidad
<i>Escherichia coli</i>	K/A o A/Ag	-	-	+	-	-	+	±
<i>Citrobacter freundii</i>	A/Ag	+	+	+	-	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	A/Ag	-	+	-	+	-	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/Ag	-	+	-	+	-	±	-
<i>Proteus mirabilis</i>	K/A	+	+	+	-	+	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	K/A	+	+	+	-	+	+	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	K/K o K/N	-	+	+	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K/K o K/N	-	+	+	-	-	-	+

Tabla tomada del manual: Laboratory exercises in microbiology, 4ta ed.

Legenda: K/A= alcalina en el slant/acido en el fondo, K/K= alcalino en el slant/alcalino en el fondo, A/A= ácido slant/ácido fondo, A/Ag=ácido slant/ácido en el fondo con gas, K/N = alcalino slant/neutral fondo, += positivo a la prueba, - = negativo a la prueba, ± = variable

Referencias

Black, J.G. (2012). Oral and gastrointestinal diseases. In: *Microbiology: Principles and explorations* (8^{va} ed., pp. 680-721). NJ: John Wiley & Sons, Inc.

Cappuccino, J.G. & Sherman, N. (1996). *Microbiology: a laboratory manual* (4^{ta} ed.). Menlo Park, California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

Farmer III, J.J., Howard, B.J. & Weissfeld, A.S. (1987). Enterobacteriaceae. En: *Clinical and pathogenic microbiology* (pp. 289-328). St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company.

Harley, J.P. & Prescott, L.M. (1999). *Laboratory exercises in microbiology* (4^{ta} ed.). Dubuque, IA: WCB/McGraw-Hill.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. & Clark, D.P. (2012). *Brock biology of microorganisms* (13^{va} ed.). San Francisco, California: Pearson Education, Inc.

Norell, S.A. (1985). *Laboratory text in introductory microbiology for health sciences students*. Englewoods cliffs, NJ: Prentice-Hall, Inc.

Thursby, E. & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474, 1823-1836. Doi:10.1042/BCJ20160510

