

Aislamiento e identificación de bacterias en el reactor RP-10 del Centro Nuclear “RACSO”

Midalit Medina^{1,2}, Milagros Quintana^{1,3}, Johanna Sánchez⁴, Juan Agapito⁵, Ángel Revilla⁶, Marco Espinoza^{1,*}

¹ IPEN, Laboratorio de Citogenética y Radiobiología, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

² Universidad Nacional de San Agustín, Escuela Profesional y Académica de Biología, Arequipa, Perú

³ Universidad Peruana Cayetano Heredia, Unidad de Biotecnología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo de Ciencia y Tecnología (LID), Av. Honorio Delgado 430, Lima, Perú

⁴ Universidad Peruana Cayetano Heredia, Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Av. Honorio Delgado 430, Lima, Perú

⁵ IPEN, Laboratorio de Biología Molecular, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

⁶ IPEN, Dirección General de Instalaciones, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

Resumen

El objetivo de esta investigación fue aislar e identificar las bacterias que viven en el fondo de la pileta auxiliar del reactor nuclear RP-10 del Centro Nuclear RACSO. Se colectaron muestras de bacterias a partir del agua y de la superficie de un tapón de aluminio y se inocularon sobre diferentes medios de cultivo para su aislamiento. Para la caracterización fenotípica se usaron técnicas microbiológicas como la coloración de Gram, coloración de esporas y pruebas bioquímicas. Esto ha permitido identificar presencia de diferentes géneros bacterianos tales como *Bacillus*, *Staphylococcus* y bacilos gram negativos. A su vez se muestran avances en la identificación molecular así como en la estandarización de la extracción de ADN y amplificación parcial del gen 16S rRNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Abstract

The aim of this study was isolation and identification of bacteria living in the bottom of the auxiliary pool of the RP-10 in the Nuclear Center RACSO. Samples of bacteria from water and from the surface of an aluminum stopple were collected and inoculated into different media for culturing and isolation. For phenotypical characterization, microbiological techniques as Gram staining, spore staining and biochemical assays were used. This permitted to us to identify presence of different bacterial genus like *Bacillus*, *Staphylococcus* and Gram-negative bacteria. At the same time, advances in molecular identification, DNA extraction standardization and partial amplification of gene 16S rRNA using PCR technology are shown.

1. Introducción

En las centrales nucleares el combustible nuclear gastado se almacena en piscinas de hormigón revestidas de acero inoxidable que se denominan piscinas de almacenamiento de combustible nuclear gastado, éstas a su vez actúan de blindaje. La calidad del agua debe ser extremadamente alta. Ello se logra con un sistema de filtración y desmineralización para evitar la acumulación de sales y el riesgo de corrosión, así como la ultraclarificación a base de resinas. Sin embargo, a pesar de las condiciones oligotróficas y de radiactividad se ha reportado la existencia de microorganismos en el sistema de agua y dentro de las piscinas de almacenamiento de combustible nuclear gastado de una Central

Nuclear activa [1,2,3,4], así como en muestras de suelo alrededor de la Central Nuclear de Chernobyl [5].

Los microorganismos adaptados a este ambiente (denominados extremófilos), se organizan en comunidades conocidas como biofilms donde capturan los radionúcleos presentes en las aguas de las piscinas nucleares, especialmente ⁶⁰Co [6,7] y también acumulan selectivamente metales pesados [8]. Esta capacidad de retención abre la posibilidad del empleo de estos microorganismos en la bioremediación de aguas radiactivas; y para tal fin, el primer paso es identificarlos.

* Correspondencia autor: mespinoza@ipen.gob.pe

En este trabajo se presentan los avances en la identificación de la biodiversidad bacteriana existente en la pileta auxiliar del reactor nuclear RP-10 del Centro Nuclear RACSO.

2. Materiales y Métodos

Identificación Fenotípica

2.1. Medios de Cultivo

Para el cultivo y aislamiento de los microorganismos existentes en la pileta auxiliar del reactor nuclear RP-10 del Centro Nuclear RACSO se emplearon los medios reportados [5]:

Caldo Triptona Soya (TSB, 30 g/L, pH 7.3±0.1); Agar Triptona Soya (TSA, 40 g/L, pH 7.3±0.1); Agar Nutritivo (AN, 28 g/L, pH 7.0±0.2); Agar Cerebro Corazón (BHI, 52 g/L, pH 7.4±0.2); Agar STC (pH 7.2).

2.2. Cultivo de microorganismos

Se realizó 2 tipos de toma de muestra en el cementerio de elementos combustibles gastados al fondo de la pileta auxiliar del reactor nuclear RP-10:

a) En agua

Se colectó agua en una botella estéril de un 1L y se analizó por el método de las membranas filtrantes. Para tal fin, se filtró 100 ml de la muestra mediante vacío a través de filtros de membrana Millipore de nitrocelulosa de 45 mm de diámetro por 0.2 µm de poro [9]. Los filtros se colocaron sobre los siguientes medios sólidos: TSA, AN, BHI y STC e inmediatamente se incubaron a 30 °C hasta que aparecieron colonias visibles. Las colonias aisladas con características morfológicas diferenciadas (forma, borde, elevación, color) se resembraron en los medios donde crecieron hasta obtener cultivos axénicos.

b) En superficie no plana

Se empleó el método del hisopo para muestrear la superficie [9] de un tapón de aluminio ubicado en el fondo de la pileta auxiliar. Se identificó las zonas de corrosión y con un hisopo estéril se restregó varias veces, enseguida se introdujo en un tubo con 5 ml de caldo TSB el que se dejó incubando a 30 °C durante 24 h. Con ayuda de un asa de vidrio se sembró 100 µl de la suspensión bacteriana en placas con medios sólidos (TSA, AN, BHI y STC). Las placas se incubaron a 30 °C hasta que aparecieron

colonias visibles y se resembró hasta obtener cultivos puros.

Las cepas bacterianas se almacenaron en tubos con TSA a 4 °C. A su vez, se conservaron a -20°C en caldo TSB al 15 % de glicerol.

2.3. Coloración de Gram y de esporas

La morfología celular de los cultivos puros en fase exponencial (cultivos de 24 h) se analizó mediante la coloración de Gram [10]; para tal fin se preparó un frotis con una gota del caldo bacteriano sobre láminas portaobjetos y se fijó por calor. Luego, se agregaron gotas de cristal violeta y se dejó actuar por 1 min. Después, cada lámina se lavó a chorros de agua corriente, y se cubrió con gotas de lugol durante 2 min. Se lavó la lámina y enseguida se decoloró con alcohol acetona hasta que la preparación dejó de perder color. Se enjuagó la lámina con abundante agua corriente para eliminar el resto de disolvente y luego se tiñó con safranina durante 1 min. Se lavó con agua corriente para eliminar el colorante de contraste y finalmente las láminas se secaron a temperatura ambiente.

En la tinción de esporas se emplearon cultivos en fase estacionaria para dar lugar a que las bacterias produzcan las esporas [10]. Los frotis se colorearon con gotas de verde de malaquita al 5 % y las láminas se expusieron a la llama del mechero de tal forma, que el colorante humeó durante 5 min y el frotis no se secó ya que se añadió más colorante cuando éste se evaporaba. La lámina se lavó con abundante agua para eliminar el exceso de colorante. Luego se agregó safranina por 30 seg y se lavó a chorros con abundante agua el exceso de colorante. Por último, la preparación se secó a temperatura ambiente. En ambos casos las láminas coloreadas se examinaron en un microscopio ZEISS Axioscop 2 provisto de un lente de inmersión (100X).

Identificación Bioquímica

2.4. Medios de Cultivo

Para la identificación bioquímica de las cepas bacterianas se utilizaron los siguientes medios de cultivo [10]: Agar Triptona Soya (TSA); Agar citrato de Simmons (Cit, 24.2 g/L, pH 6.8 ± 0.2); Agar Hierro Tres Azúcares (TSI, 65 g/L, pH 7.4 ± 0.2); Agar Lisina Hierro (LIA, 32 g/L, pH 6.7 ± 0.2); Caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer (RMVP, 17 g/L, pH 6.9 ± 0.2); Caldo Urea

(Urea, 38.5 g/L, pH 6.8 ± 0.2); Caldo con dextrosa (Dext), manitol (Mani), rafinosa (Raf) y sorbitol (Sorb); Gelatina Nutritiva (Gel, 128 g/L, pH 6.8 ± 0.2), Medio SIM (SIM, 30 g/L, pH 7.3 ± 0.2).

2.5. Pruebas bioquímicas

Cada una de las cepas bacterianas se sembró en agar TSA y se incubaron a 37°C por 24h, estos cultivos jóvenes se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas:

Catalasa (peróxido de hidrógeno); Oxidasa (reactivo oxidasa); Rojo de Metilo y Voges Proskauer (RMVP); Movilidad, producción de indol y liberación de H₂S (SIM); Fermentación de los carbohidratos (TSI); Metabolismo de la lisina (LIA); Licuefacción de la gelatina (Gel); Metabolismo del citrato (Cit); Hidrólisis de la urea (Urea); Utilización de la dextrosa, sorbitol, rafinosa y manitol.

Identificación Molecular

2.6. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico se emplearon las cepas bacterianas puras aisladas por sus características fenotípicas. Primeramente se reactivaron las bacterias inoculando una colonia en 3ml de caldo TSB y se dejó a 37 °C por 24 horas. Se centrifugó 1000 µl del caldo bacteriano a 9000 rpm durante 15 min. Luego el pellet celular se resuspendió en 250 µl de buffer TE-Lizosima (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, Lizosima 10mg/ml) y se incubó a 37 °C en baño María por 1 hora. A la suspensión se adicionó 25 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) y se dejó incubando a 37 °C hasta el día siguiente. Después se agregó 400 µl de buffer de Lisis (Tris-HCl 200 mM pH 8, NaCl 100 mM, SDS 1 %) y se homogenizó suavemente por inversión. Inmediatamente los tubos se sometieron en agua a 70 °C durante 1 min y luego en hielo durante 1 min (por tres veces). Al término del choque térmico se añadió 600 µl de fenol a los tubos, se homogenizaron por inversión y luego se centrifugaron a 6500 rpm durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a tubos estériles y se les agregó cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), y se procedió de manera similar que con el fenol. Se adicionó 1 ml de isopropanol frío para precipitar el ADN y se dejó a -20 °C durante 30 min; luego los tubos se centrifugaron a 13000 rpm por 20 min. Finalmente los precipitados de ADN se lavaron con 1ml de etanol al 70 % y se resuspendieron 100 µl de buffer TE.

La concentración de ADN se analizó por comparación con la intensidad de la banda mayor del marcador λ/HindIII de concentración conocida (50ng/µl) en un gel de agarosa al 1 %.

2.7. Amplificación parcial del gen 16S rRNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El gen 16S rRNA de las cepas bacterianas aisladas se amplificó en un termociclador TECHNE TC-412 con los primers universales complementarios de *E. coli*:

27f (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1387r (5'GGGCGGWGTGTACAAGGC 3') [11, 12, 13]. Para una reacción de 50 µl se empleó 50 ng de ADN genómico, buffer de reacción PCR 1X, 2.5mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada primer, 200 µM de mezcla de dNTPs, 2 % de DMSO (v/v) y 1 unidad de TaqPol. Las condiciones de PCR [13] fueron: desnaturalización a 95 °C por 5 min seguido por 30 ciclos de amplificación a 95 °C por 30 seg, 57 °C por 30 seg y 72 °C por 90 seg; seguido por un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min y un paso final de enfriamiento a 4 °C.

Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TBE 1X. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis horizontal (BioRad, Wide Mini SubTM Cell) a 60V por 60 min en presencia de un marcador estándar de peso molecular (λ/Hind III) de concentración conocida. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg/ml.) durante 15 min y enjuagados en agua destilada. Los resultados se visualizaron y fotografiaron en un analizador de imágenes (BioRad, GelDocTM XR System).

2.8. Purificación de amplificadas

Los productos de PCR se purificaron según el protocolo Wizard® PCR Preps DNA Purification System [14]. El proceso de purificación se evaluó por electroforesis en gel de agarosa (1 %) descrita anteriormente.

3. Resultados y Discusión

3.1. Identificación Fenotípica

Se obtuvieron 19 cultivos puros que fueron caracterizados como se detalla en la Tabla 1. Con la coloración de Gram se identificaron las siguientes morfologías: 3 cepas cocos Gram positivas, 8 cepas bacilos Gram

positivas y 8 cepas bacilos Gram negativas (Fig. 1).

A través de la coloración de esporas se determinó que las cepas de forma bacilar Gram + eran esporuladas (Fig. 2). Mediante el sistema de clasificación de Bergey's Manual [15] se logró identificar lo siguiente: Las 8 cepas bacilos Gram positivos corresponden al Género *Bacillus* por la visualización microscópica de sus células en forma de bacilos rectos y voluminosos, que se disponían en pares y cadenas (Fig. 1a). Resultaron Gram positivos con la formación de una endospora (Fig. 2) no deformante por célula y también presentaron motilidad (Fig. 3). Se caracterizaron por su crecimiento aeróbico, facultativamente anaeróbico y con metabolismo quimioorganotrofo (fermentación de la glucosa) (Fig. 4). Y además, presentaron reacción enzimática de catalasa positiva.

Las 3 cepas de forma cocoide corresponden al Género *Staphylococcus* ya que resultaron cocos Gram positivos (Fig. 1c) y sus células se disponían en forma aislada, pares, en racimos y agrupaciones. Presentaron reacción catalasa positiva y movilidad negativa. Fueron capaces de producir ácido de la glucosa tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

Nuestros resultados concuerdan con los estudios previos realizados en la central Nuclear de Cofrentes, España[1,2,3,4]. La existencia de *Bacillus* y *Staphylococcus* está en correlación con la resistencia a la radiación gamma y sobretodo las bacterias esporuladas que son relativamente resistentes. Con respecto a las bacterias Gram negativas no esporuladas también se han aislado a partir del agua de la piscina de almacenamiento de combustible nuclear gastado [2].

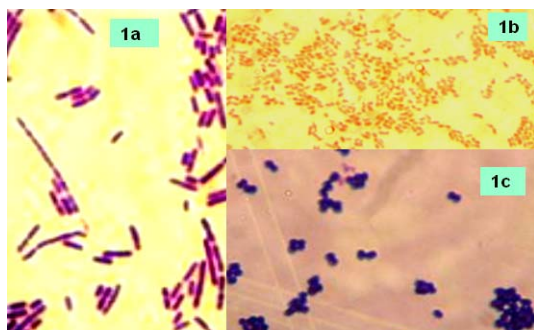


Figura 1: Morfología de las bacterias aisladas en medios de cultivo. **1a** Bacilos Gram positivos. **1b** Bacilos Gram negativos. **1c** Cocos Gram positivos. Aumento 1000 X.



Figura 2: Bacilos esporulados (espora se tiñe de color verde, ver flecha).

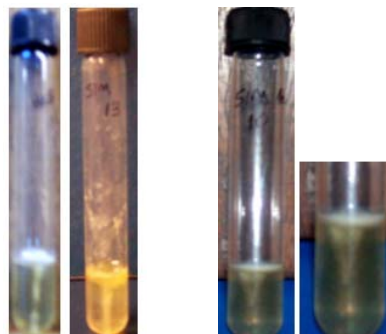


Figura 3: Las bacterias crecen en todo el medio SIM, por lo tanto se movilizan.



Figura 4: Crecimiento de bacterias del género *Staphylococcus* en medio sólido.

3.2. Identificación Molecular

Las condiciones de extracción de ADN se estandarizaron en base al protocolo de Barns [16] y modificado según Sambrook [17], de esa manera se adaptó a las condiciones de nuestro laboratorio. Se logró extraer suficiente ADN (alrededor de 50 ng/ul) a partir de los cultivos puros aislados de la pileta auxiliar del reactor nuclear (Fig.5).

En cuanto a la amplificación del gen 16S rRNA de las eubacterias aisladas se establecieron las condiciones óptimas con los primers universales 27f y 1387r (Fig. 6) que coincidieron con lo reportado por Quintana[13] con la variante respecto a la cantidad de ADN empleado [1]. Los productos de PCR que se observaron en gel

de agarosa al 1 % correspondieron al tamaño del gen 16S rRNA bacteriano, es decir alrededor de 1.5 Kpb.

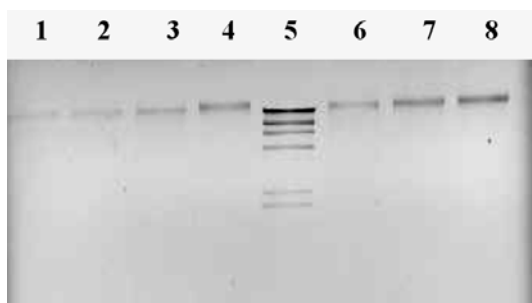


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa 1% del ADN genómico de las cepas bacterianas en estudio. Buffer TBE 1X, 60V, 60 min. **1.** Cepa 1, **2.** Cepa 5, **3.** Cepa 9, **4.** Cepa 10, **5.** Marcador λ /HindIII (50 ng/ul), **6.** Cepa 11, **7.** Cepa 13, **8.** Cepa 14.

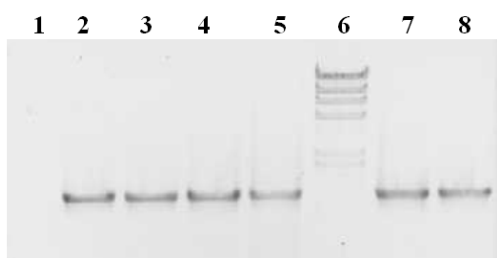


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa 1% de los amplificados del 16S rRNA de las bacterias en estudio. Buffer TBE 1X, 60V, 60 min. **1.** control negativo del PCR, **2.** Cepa 1, **3.** Cepa 5, **4.** Cepa 9, **5.** Cepa 10, **6.** Marcador λ /HindIII (50 ng/ul), **7.** Cepa 11, **8.** Cepa 13.

El proceso de la purificación directa del ADN a partir del producto amplificado fue óptimo ya que al visualizarlo en un gel de agarosa 1 % se comprobó su pureza libre de contaminantes (Fig.7). Los productos purificados se han resuspendido y almacenado en 20 μ l de buffer TE para su identificación molecular definitiva; para tal efecto serán secuenciados en un ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias obtenidas se compararán directamente con todas las secuencias reportadas y depositadas en la base de datos de NCBI (National Center of Biotechnology Information) usando el programa Fasta3, y de esa manera se determinará su correspondiente identificación.

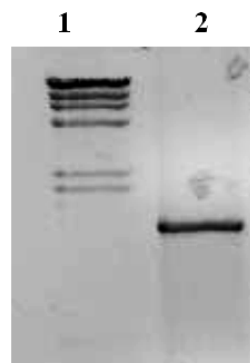


Figura 7: Aspecto de la electroforesis en el gel de agarosa 1% del producto de PCR purificado con Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega). **1.** Marcador λ /HindIII (50 ng/ul), **2.** Cepa 1.

4. Conclusiones

Se han establecido las condiciones óptimas para el cultivo y el aislamiento de bacterias provenientes del fondo de la pileta auxiliar del reactor nuclear RP-10 del Centro Nuclear RACSO, esto ha permitido identificar bacterias gram positivas tales como *Bacillus-Staphylococcus* y también bacilos gram negativos.

La estandarización para la extracción de ADN de bacterias gram positivas y gram negativas en estudio se ha optimizado, así como la amplificación del gen 16S rRNA con los primers universales 27f y 1387r. Este avance permitirá la identificación molecular por la técnica de Secuenciación de ADN.

5. Referencias

- [1] Chicote E, Moreno DA, García AM, Sarró MI, Lorenzo PI, Montero F. Biofouling of the walls of a spent nuclear fuel pool with radioactive ultrapure water. *Biofouling*. 2004; 20(1):35-42.
- [2] Chicote E, García AM, Moreno DA, Sarró MI, Lorenzo PI, Montero F. Isolation and identification of bacteria from spent nuclear fuel pools. *Journal Industrial of Microbiology & Biotechnology*. 2005; 32:155-162.
- [3] Sarró MI, García AM, Moreno DA. Biofilm formation in spent nuclear fuel pools and bioremediation of radioactive water. *International Microbiology*. 2005; 8:223-230.
- [4] Sarró MI, García AM, Moreno DA, Montero F. Development and characterization of biofilms on stainless steel and titanium in spent nuclear fuel pools.

- Journal Industrial of Microbiology & Biotechnology. 2007; 34:433-441.
- [5] Zavilgelsky GB, Abilev SK, Sukhodolets VV, Ahmad SI. Isolation and analysis of UV and radio-resistant bacteria from Chernobyl. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 1998; 43:152-157.
- [6] Moreno DA, Montero F. Procedimiento de biorremediación para la concentración y eliminación de radionucleidos en las aguas radiactivas de las piscinas nucleares. 2004. Patente Española número P2002-00006.
- [7] Diósi G, Telegdi J, Farkas G, Gázsó LG, Bokori E. Corrosion influenced by biofilms during wet nuclear waste storage. 2003. International. Biodeterioration & Biodegradation. 51: 151- 156.
- [8] Selenska-Pobell S, Panak P, Miteva V, Boudakov I, Bernhard G, Nitsche H. Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. sphaericus* from drain waters of a uranium waste pile. FEMS Microbiology Ecology. 1999; 29:59-67.
- [9] Agurto T. Manual de Técnicas en Microbiología. 1ra. Ed. Lima: Imprenta La Pluma Fuente S.A; 1989.
- [10] Agurto T, Guerra A. Microbiología Básica. Coloraciones de bacterias y la bioquímica en los medios de cultivos. Lima: Editorial Imprenta Unión; 2004.
- [11] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing, En: Stackebrandt E, Goodfellow M. Editors. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. New York: Wiley; 1991. p 115-175.
- [12] Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology. 1998; 64(2): 795-799.
- [13] Quintana M, Ly M, Montoya Y, Bauer J, Espinoza J, Espinoza M. Identificación molecular de microorganismos acidófilos en un tanque industrial de biooxidación de arsenopirita para la recuperación de Oro. En: Instituto Peruano de Energía Nuclear. Informe Científico Tecnológico 2006. Lima: Perú; 2007. p. 214-222.
- [14] PROMEGA. Wizard® PCR Preps DNA Purification System Technical Bulletin. Instructions for use of products A9280, A9281 AND A9282. Promega Corporation, USA, 2008.
- [15] Sneath P, Mair N, Sharpe E, Holt J. Bergey's manual of systematic bacteriology II. USA: Williams & Wilkins; 1986.
- [16] Barns SM, Fundyga RE, Jefferies MW, Pace NR. Remarkable diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. 1994. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91: 1609-1613.
- [17] Sambrook, J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 1989.

Nota: El presente trabajo ha sido desarrollado en el marco del Proyecto "Biorremediación de minas abandonadas" PER/8/014.

Tabla 1: Características fenotípicas diferenciales de las cepas bacterianas aisladas de la pileta auxiliar del reactor nuclear RP-10 del Centro Nuclear RACSO. El símbolo + indica reacción positiva y el símbolo – significa reacción negativa.

Características	Cepa N°																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Coloración de Gram	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Forma de bacilos	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Forma de cocos	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Formación de endoesporas	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Movilidad	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Prueba de Voges Proskauer	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Prueba de rojo de metilo	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Acidez de glucosa	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
lactosa	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
sacarosa	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Gas de glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Licuefacción de la gelatina	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Utilización del citrato	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
Formación de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina descarboxilasa	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Lisina deaminasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de la urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Utilización de dextrosa	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
sorbitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
rafinosa	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
manitol	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-