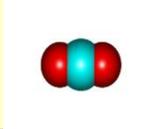
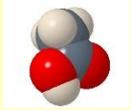
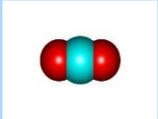
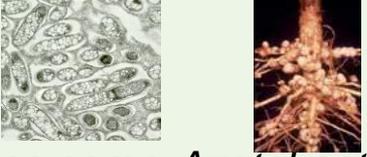
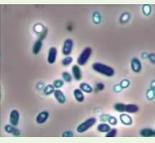


- 03.1 Grupos nutricionales de los microorganismos.
- 03.2 Obtención de energía: reacciones red-ox, fosforilación oxidativa, fosforilación a nivel de sustrato y fotofosforilación.
- 03.3 Asimilación y uso del carbono.
- 03.4 Medios de cultivo: clasificación, diseño y aplicaciones.
- 03.5 Caracterización de la actividad metabólica microbiana.

03. NUTRICIÓN Y METABOLISMO

NOMENCLATURA PRIMARIA: Fuente de Energía y Carbono

Tipo		Ejemplo
Fototróficas (fuente de energía luz)		
FOTOAUTOTRÓFICAS (autotróficas)	 f. energía luz	 f. carbono CO ₂
FOTOHETEROTRÓFICAS (fotoorganotróficas)	 f. energía luz	 f. carbono orgánico
Quimiotróficas (Fuente de energía reacciones químicas)		
QUIMIOAUTOTRÓFICAS (litotróficas o quimiolitótrofas)	 f. energía reacciones quím. inorg.	 f. carbono CO ₂
QUIMIOHETEROTRÓFICAS (organotróficas o heterotróficas)	 f. energía reacciones quím. orgánicas.	 f. carbono compuestos orgánicos
		<i>Chromatium sp</i>
		<i>Rhodopseudomonas sp</i>
		<i>Acidithiobacillus sp</i>
		<i>Escherichia coli</i>

FIJADOR DE NITRÓGENO usa el N ₂ atmosférico.	NO FIJADOR DE NITRÓGENO	
<p>Hay fijadores simbióticos como <i>Rhizobium sp</i></p>  <p>libres como <i>Azotobacter sp</i></p>  <p>Reducción N_2</p>  <p>NH₃ o compuestos de amoniaco: NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄</p>	<p>ASIMILADORES</p> <p>Usan nitrógeno inorgánico (Amoniac o compuestos de amonio) para incorporarlo a moléculas orgánicas.</p> <p>NH₃ + α-cetoácido</p>  <p>aminoácido</p>	<p>TRANSAMINADORES</p> <p>Usan nitrógeno orgánico (aminoácidos, peptonas, bases nitrogenadas, urea, ácido úrico) para trasferir el grupo amino de una aminoácido a un α-cetoácido.</p> <p>Aminoácido1 + α-cetoácido2</p>  <p>α-cetoácido1 + Aminoácido2</p>

NOMENCLATURA TERCIARIA: Factores de crecimiento (vitaminas, aminoácidos, bases nitrogenadas)

➤ protótrofo: no requiere factores de crecimiento añadidos en el medio de cultivo.

Medios sin vitaminas (sin f. crec) E^o, C, N y minerales → Crecimiento +

Medio con vitaminas (con f. crec.) E^o, C, N y minerales → Crecimiento +++

➤ auxótrofo: requiere factores de crecimiento añadidos en el medio de cultivo.

Medios sin vitaminas (sin f. crec.) E^o, C, N y minerales → Sin crecimiento

Medio con vitaminas (con f. crec.) E^o, C, N y minerales → Crecimiento ++

Necesidades vitamínicas de algunas bacterias:

Tiamina (B ₁)	<i>Bacillus anthracis</i>	Niacina	<i>Brucella abortus</i>
Riboflavina	<i>Clostridium tetani</i>	Piridoxina (B ₆)	<i>Lactobacillus</i> spp
Biotina	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Ácido fólico	<i>Leuconostoc dextranicum</i>
Cobalamina (B ₁₂)	<i>Lactobacillus</i> spp	Vitamina K	<i>Bacteroides melaninogenicus</i>
Ácido pantoténico	<i>Proteus morganii</i>		

EJEMPLOS PARA DEDUCIR TIPO NUTRICIONAL o requerimientos nutricionales:

a) Fotoautótrofo, solo es asimilador y transaminador, protótrofo:

Fuente de energía luz, de carbono CO_2 , no es fijador de nitrógeno, pero crece con nitrato de amonio o peptonas y puede sintetizar todos sus factores de crecimiento.

a) Fuente de energía luz, de carbono acetato, no es fijador de nitrógeno por lo que necesita nitrógeno orgánico y puede sintetizar todos sus factores de crecimiento.

Fotoheterótrofo, sólo es transaminador, protótrofo:

b) Quimioautótrofo, asimilador y transaminador, protótrofo:

Fuente de energía reacciones químicas de sustancias inorgánicas, fuente de carbono CO_2 , no es fijador de nitrógeno y crece con Cloruro de amonio o aminoácidos, puede sintetizar todos sus factores de crecimiento.

b) (Fuente de energía reacciones químicas de sustancias inorgánicas, fuente de carbono CO_2 , puede tomar el nitrógeno atmosférico, el medio necesita contar con vitamina B8.

Quimioautótrofo, fijador, auxótrofo a biotina:

NUTRIENTES. MACROELEMENTOS: son los elementos que se requieren en grandes cantidades

Elemento	Función celular
Carbono (C)	Conformación de biomoléculas, los compuestos de carbono también sirven como fuente de energía.
Hidrógeno (H)	También forma parte de las biomoléculas y del agua, además de otras sustancias y compuestos.
Oxígeno (O)	Utilizado para liberar la energía de las moléculas en los procesos respirativos. Forma parte de biomoléculas, aún en anaerobios.
Nitrógeno (N)	Constituyente importante de aminoácidos (proteínas), bases púricas y pirimidínicas (ADN y ARN), carbohidratos aminados y otros compuestos con nitrógeno (urea)
Fósforo (P)	Constituyente importante de ácidos nucleicos, interviene en reacciones metabólicas en la generación de energía (ATP) y fosforilando sustratos para su utilización por la célula
Azufre (S)	Forma parte de aminoácidos azufrados (cistina) y otros compuestos azufrados
Potasio (K)	Función de enzimas y síntesis de proteínas.
Sodio (Na)	Equilibrio osmótico, en realidad no se necesita, pero muchas sustancias se presentan en forma de sal sódica.
Calcio (Ca)	Movimiento e impulsos eléctricos, activación de enzimas.
Magnesio (Mg)	Estabiliza ribosomas, las membranas celulares, los ácidos nucleicos y es necesario para el funcionamiento de algunas enzimas.

MACRONUTRIENTES: son los que se requieren en grandes cantidades

Los macronutrientes son los compuestos químicos que se requieren en grandes cantidades, están formados por los macroelementos.

Compuesto	Ejemplo
Polisacáridos	Almidón, celulosa, paramilón, glucógeno
Monosacáridos y disacáridos	Glucosa, lactosa, galactosa, fructosa
Proteínas (polipéptidos) y digeridos	Caseína, albúmina, peptona de carne, peptona de soya
Aminoácidos	Glicina, Prolina, Arginina
Ácidos nucleicos	ADN y ARN
Lípidos	Ácidos grasos, colesterol,



MICRONUTRIENTES, elementos traza, oligoelementos, usados en pequeñas dosis

Elemento	Función celular
Cromo (Cr)	En mamíferos para metabolismo de glucosa, los microorganismos no lo requieren.
Cobalto (Co)	Vitamina B ₁₂ ; transcarboxilasa (bacterias del ácido propiónico).
Cobre (Cu)	Proteínas para la respiración, como citocromo oxidasa; o en la fotosíntesis, la plastocianina; algunas superóxido dismutasas.
Manganeso (Mn)	Activador de muchas enzimas; presente en algunas superóxido dísmutasas o en la enzima que rompe el agua en el fotosistema II, en los fotótrofos oxigénicos.
Molibdeno (Mo)	Presente en varias enzimas que contienen flavina; también en nitrógenasa, nitrato reductasa, sulfito oxidasa.
Níquel (Ni)	La mayoría de las hidrogenasas, coenzima F ₄₃₀ de los metanógenos, la deshidrogenasa de monóxido de carbono; ureasa.
Selenio (Se)	Formato deshidrogenasa: algunas hidrogenasas; el aminoácido selenocisteína.
Tungsteno (W)	Algunas formato deshidrogenasas; oxidotransferasas de los hipertermófilos.
Vanadio (V)	Vanadio nitrógenasa; bromoperoxidasa.
Zinc (Zn)	Presente en las enzimas anhidrasa carbónica, alcohol deshidrogenasa, RNA y DNA polimerasas y muchas proteínas que unen DNA.
Hierro (Fe)	Citocromos, catalasas, peroxidasas, proteínas con hierro y azufre (por ejemplo la ferredoxina), oxigenasas, todas las nitrógenasas.



EJEMPLOS DE MICROORGANISMOS Y SUS TIPOS NUTRICIONALES

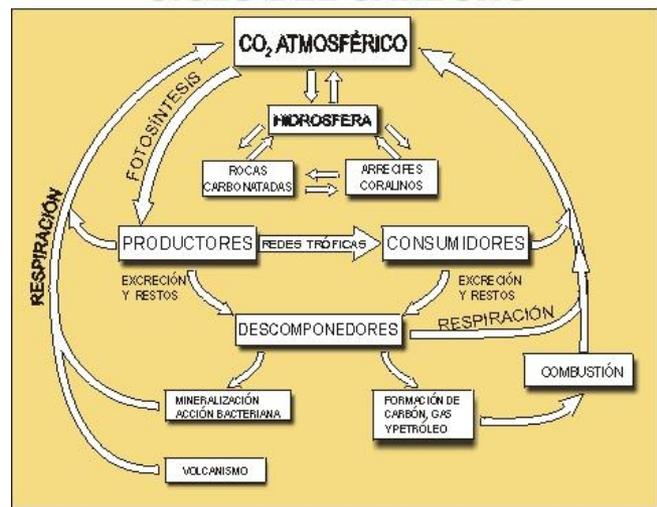
Dominio	Microorganismo	Tipo Nutricional
Archaea	<i>Thermoproteus sp, Thermococcus sp</i>	Quimioheterótrofa (aceptor S ⁰)
	<i>Archaeoglobus sp, Sulfolobus sp, Acidianus sp</i>	Químioautótrofa (litótrofa)
	<i>Halobacterium sp</i>	Fotoautótrofo (bacteriorrodopsina)
Bacteria	Bacterias Rojas no del azufre <i>Rhodobacter sp, Rhodoila sp</i>	Fotoautótrofo anoxigénico
	Bacterias rojas del azufre <i>Cromatium sp, Thiospirillum sp</i>	Fotoheterótrofos
	Bacterias verdes no del azufre	Fotoautótrofos anoxigénico
	Bacterias verdes del azufre <i>Cholorbium sp, Heliobacillus sp</i>	Fotoautótrofo anoxigénico
	Cianobacterias <i>Gloeothece sp, Anabaena sp, Fischerella sp</i>	Fotoautótrofo oxigénico
	<i>Acidithiobacillus sp (Thiobacillus sp)</i>	Quimioautótrofo (Litotrofo)
	<i>Escherichia coli, Salmonella sp, Proteus sp, Staphylococcus sp, Bacillus sp</i>	Quimiheterótrofo

EJEMPLOS DE MICROORGANISMOS Y SUS TIPOS NUTRICIONALES. (Cont.)

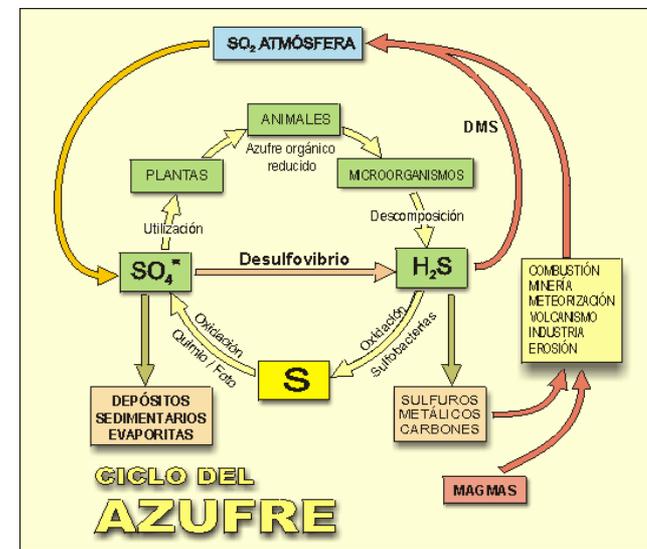
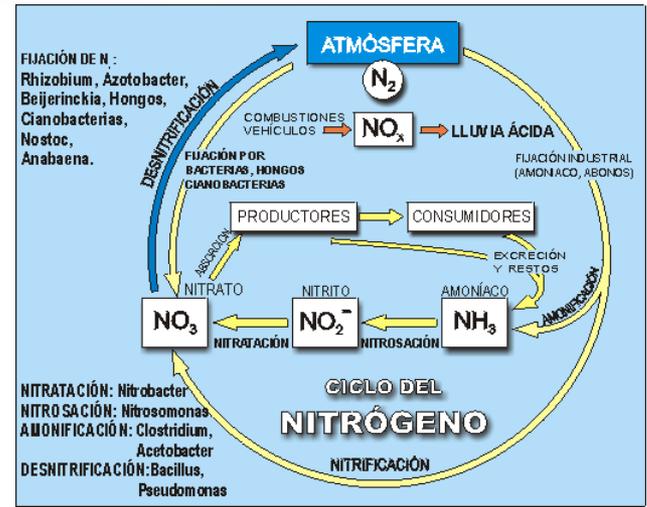
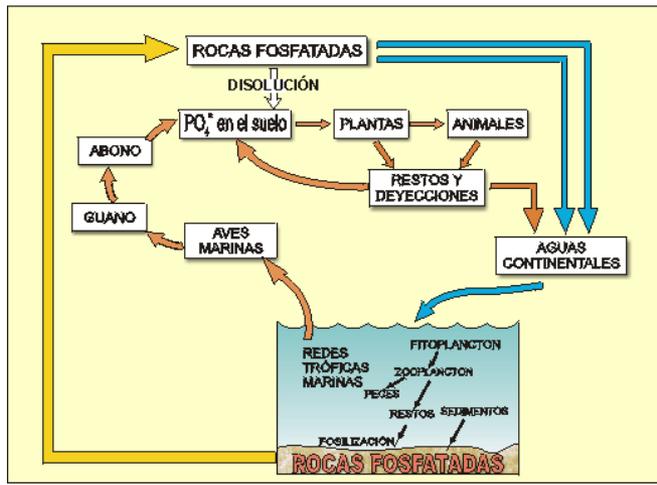
Dominio	Microorganismo	Tipo Nutricional
Eukarya	Hongos	Quimioheterótrofos
	Protozoarios	Quimioheterótrofos
	Protozoario (Euglena)	Químioheterótrofos / Fotoautótrofos (oxigénicos)
	Algas	Fotoautótrofos (oxigénicos)

CICLO DE LOS ELEMENTOS

CICLO DEL CARBONO

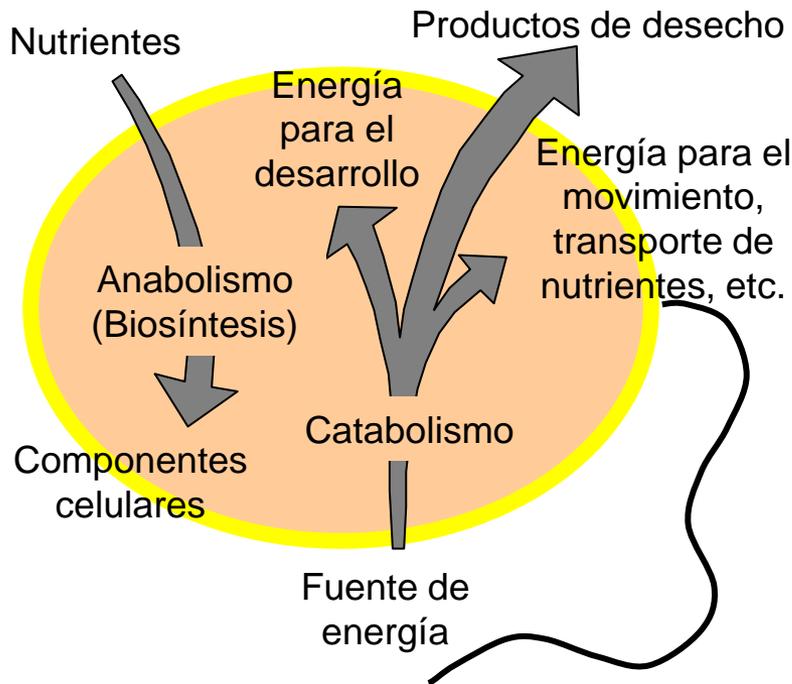


CICLO DEL FÓSFORO



03. NUTRICIÓN MICROBIANA Y METABOLISMO.

03.2 Obtención de energía: reacciones red-ox, fosforilación oxidativa, fosforilación a nivel de sustrato y fotofosforilación.



Metabolismo:

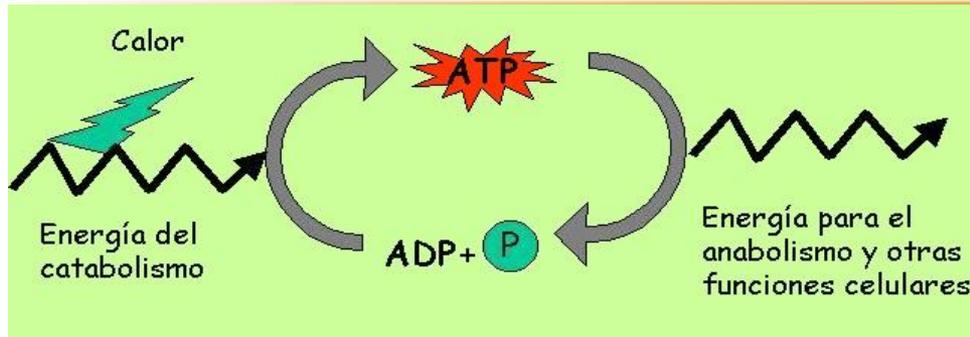
Series de reacciones químicas que realizan los seres vivos, mediadas en su mayoría por las enzimas.

Catabolismo:

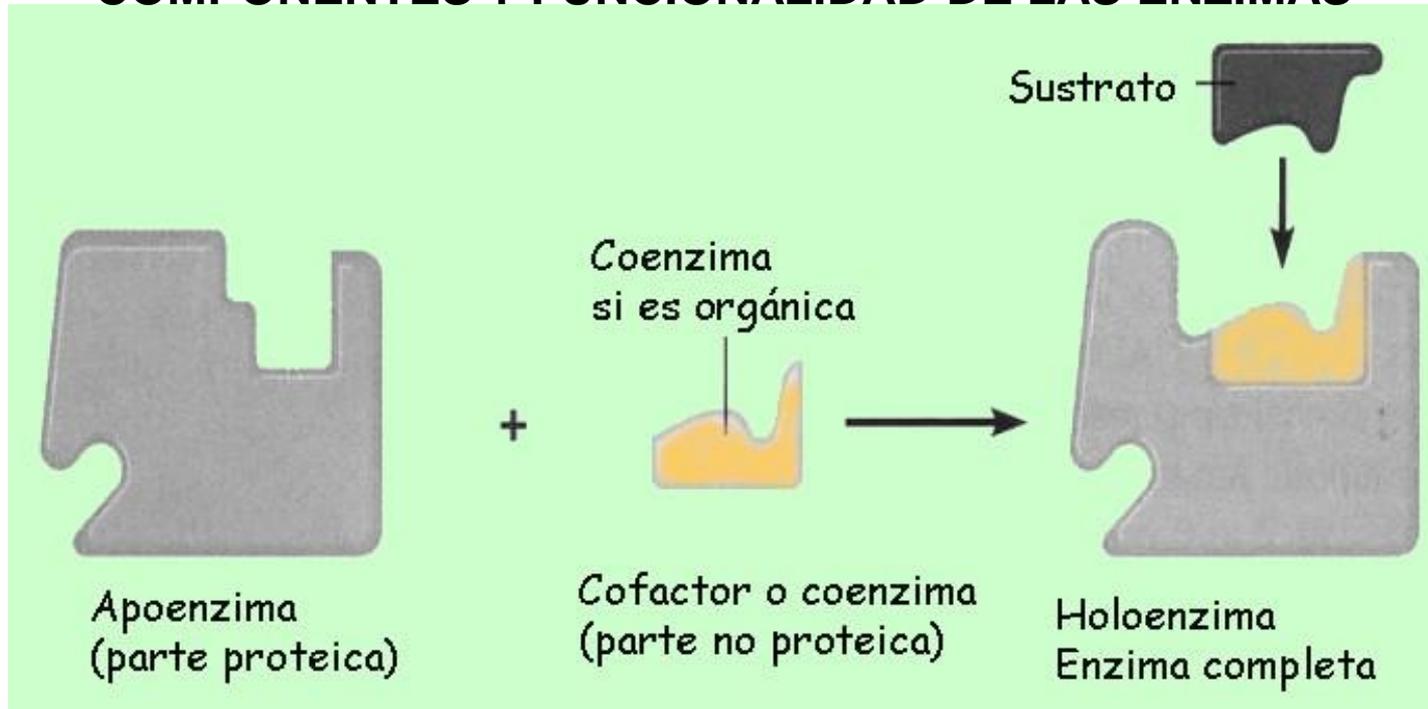
Reacciones metabólicas en las que hay liberación de energía, y se degradan las moléculas, obteniéndose metabolitos de bajo peso molecular

Anabolismo:

Reacciones metabólicas donde se invierte energía y se forman metabolitos de mayor peso molecular a partir de moléculas más pequeñas.



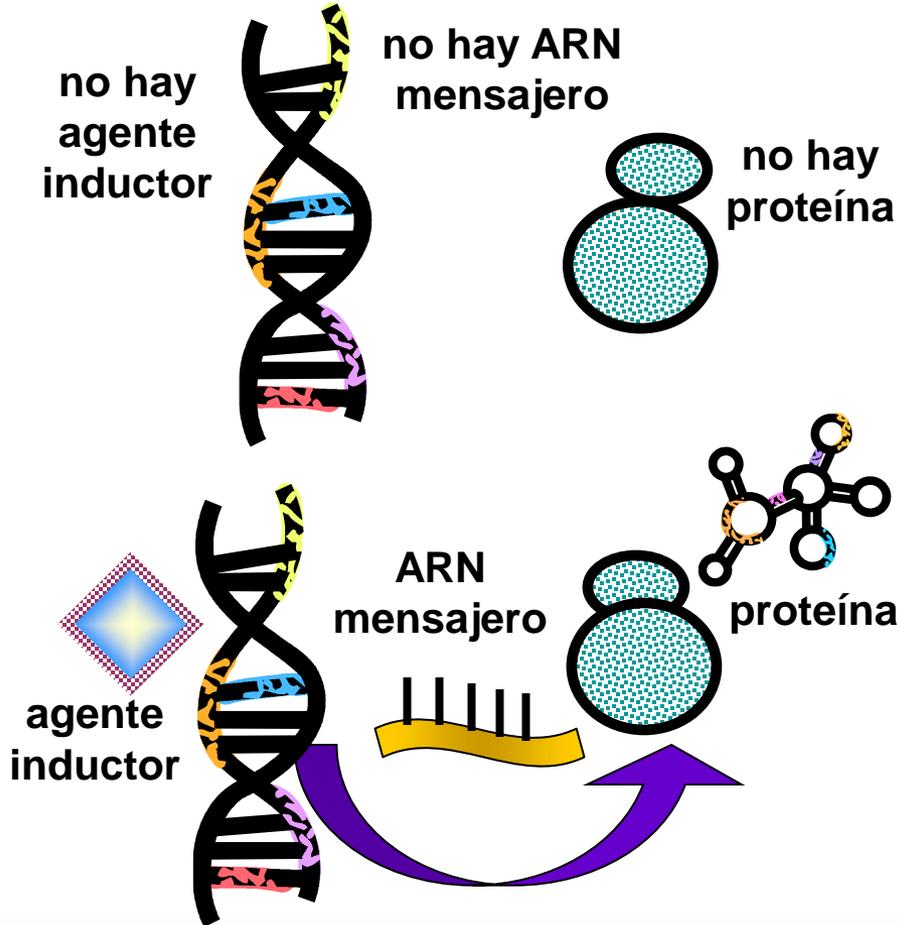
COMPONENTES Y FUNCIONALIDAD DE LAS ENZIMAS



FORMAS DE CONTROL DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

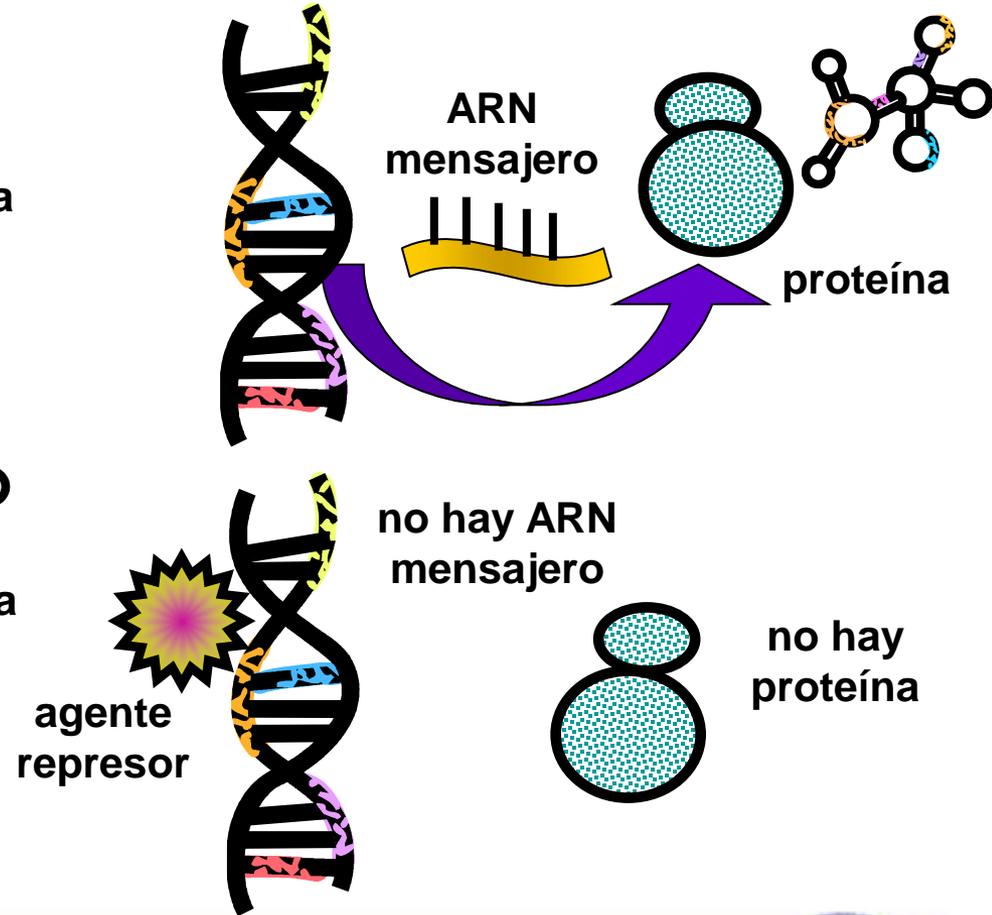
1.- INDUCCIÓN: Favorecer la síntesis de la enzima por la acción de un metabolito.

(Control genético)



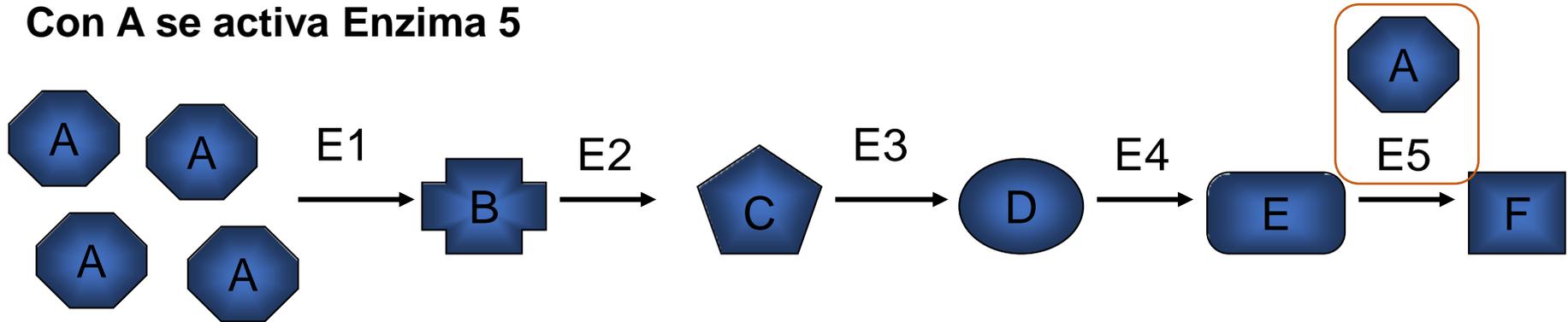
2.- REPRESIÓN: Detener síntesis de la enzima por la acción de un metabolito.

(Control genético)

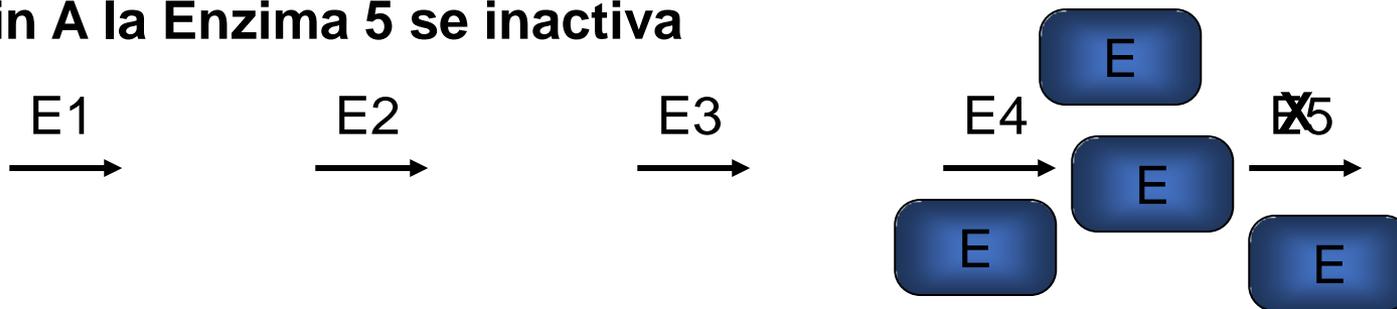


1.- ACTIVACIÓN PRECURSORA: el sustrato activa la enzima de la última reacción. (Control directo de catálisis)

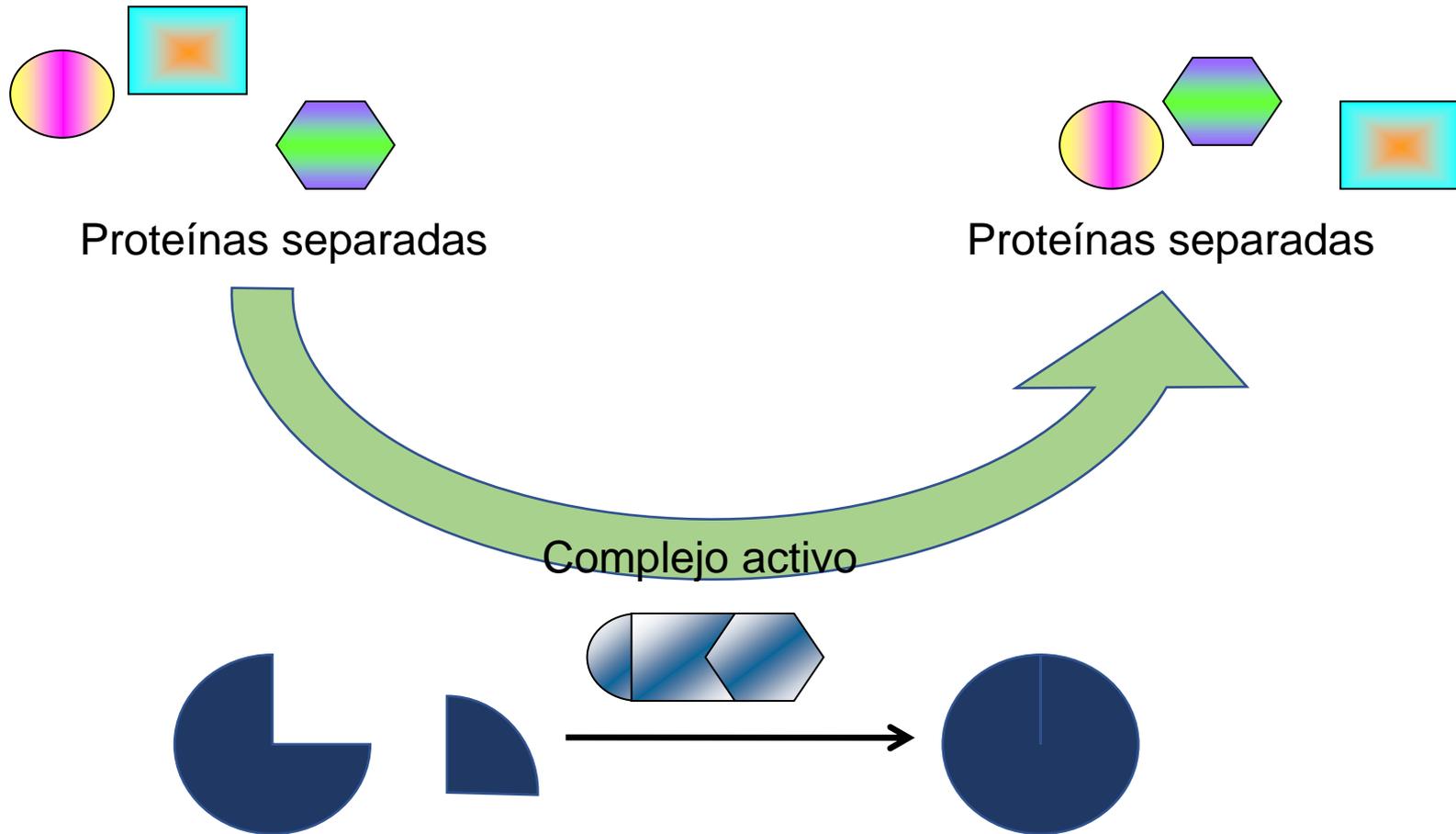
Con A se activa Enzima 5



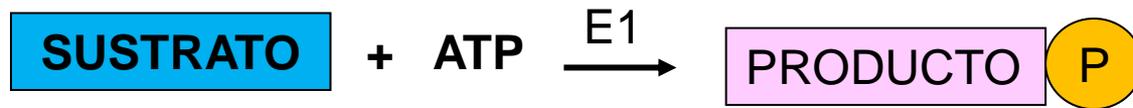
Sin A la Enzima 5 se inactiva



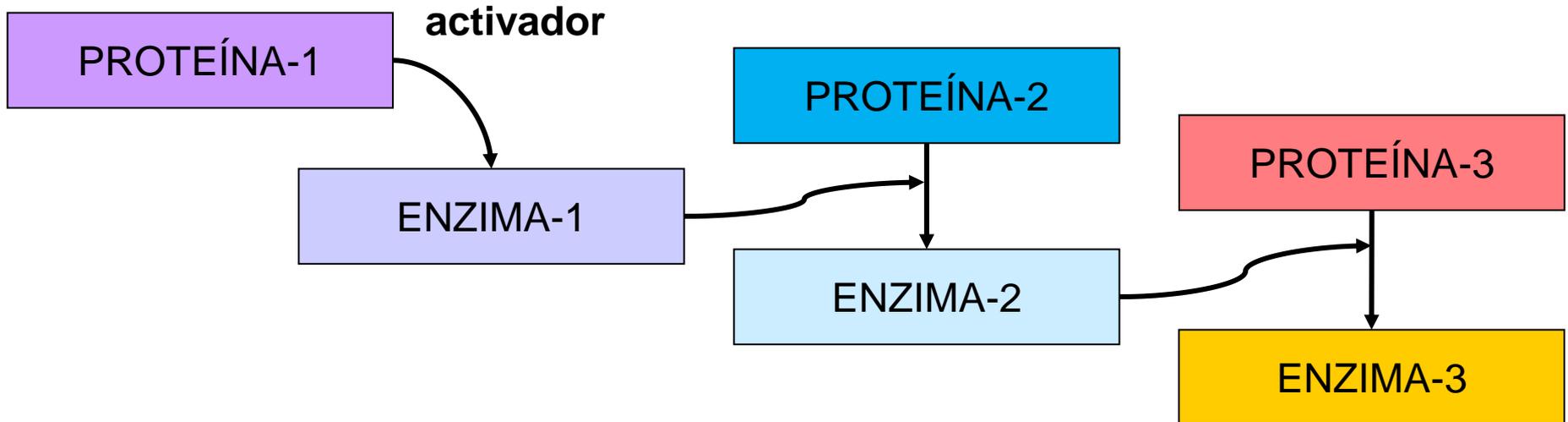
2.- ASOCIACIÓN DISOCIACIÓN: En complejos multienzimáticos. (Control directo de catálisis)



3.- CONTROL DE LA ENERGÍA DE ENLACE: por ATP. (Control directo de catálisis)



4.- ENZIMAS ACTIVADAS: enzimas que actúan sobre otras. (Control directo de catálisis)

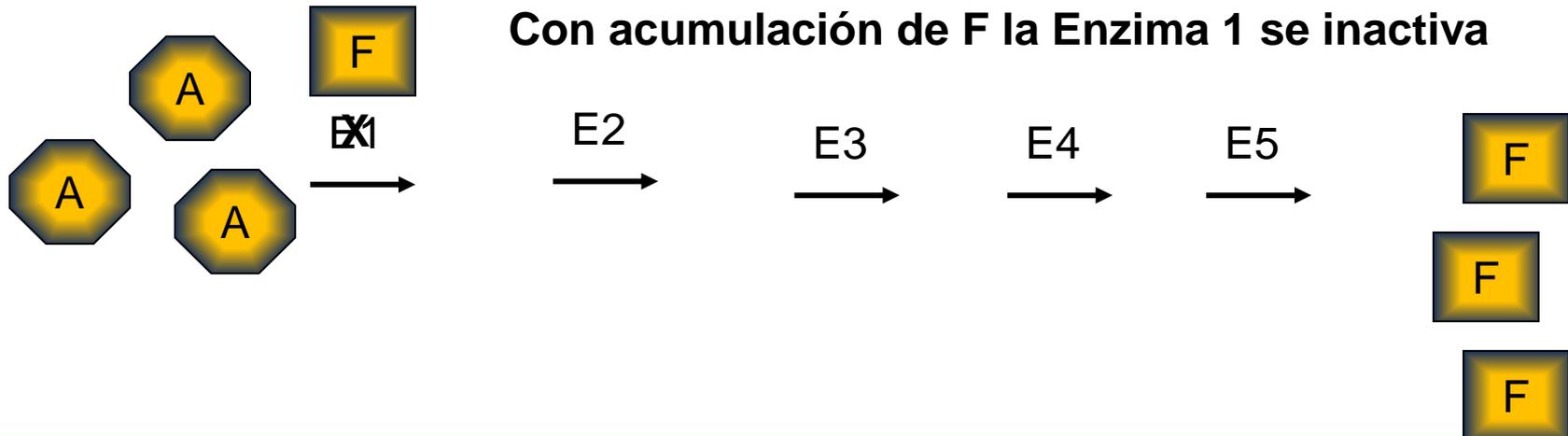
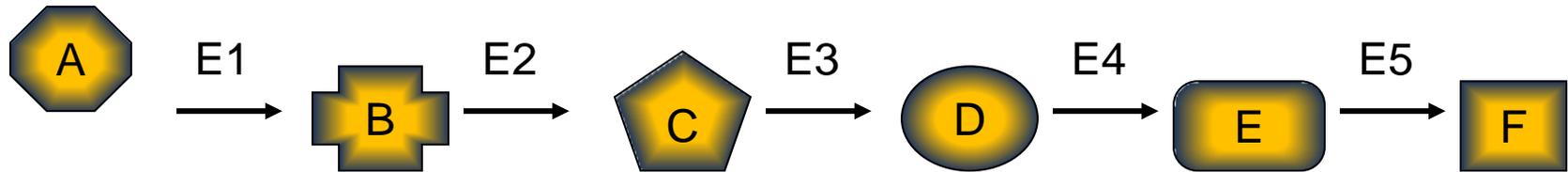


Sin activador

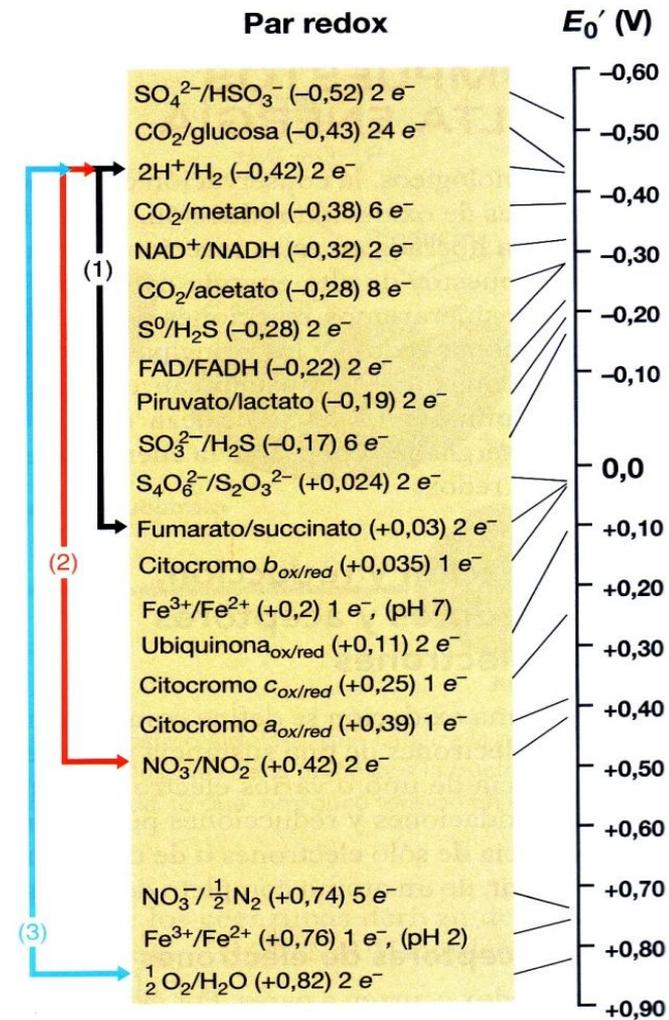
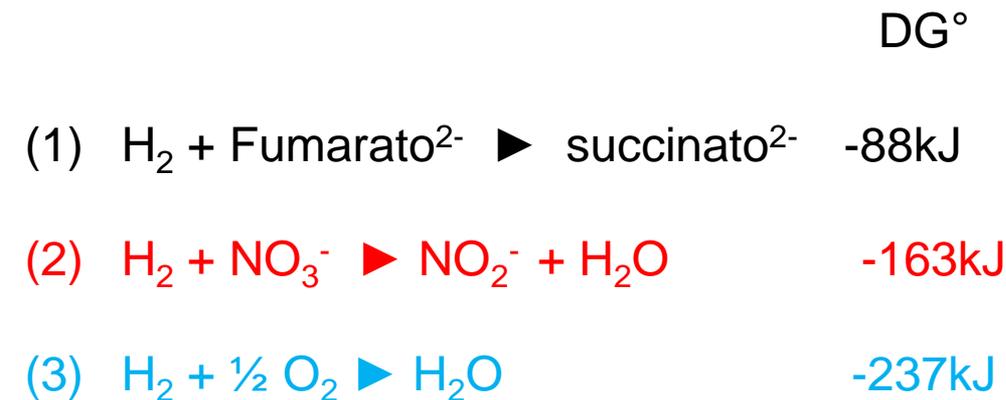


5.- INHIBICIÓN POR RETROALIMENTACIÓN: los productos finales detienen la acción enzimática. (Control directo de catálisis)

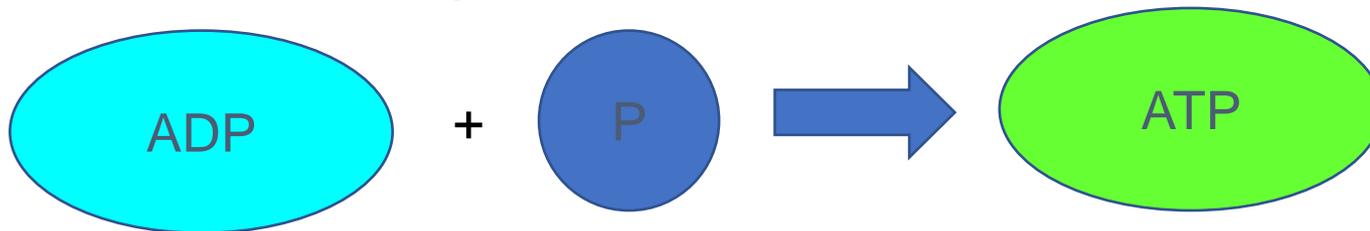
Sin acumularse F la Enzima 1 esta activa



DIFERENCIAL DE POTENCIAL. Ejemplos de moléculas orgánicas e inorgánicas.

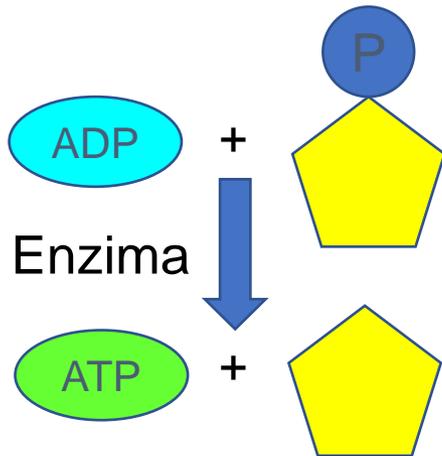


En sistemas biológicos sirve para generar compuestos energéticos fáciles de usar en el metabolismo. Es el proceso de generar ATP a partir de ADP y un fosfato, utilizando las fuentes de energía propias de cada tipo microbiano.

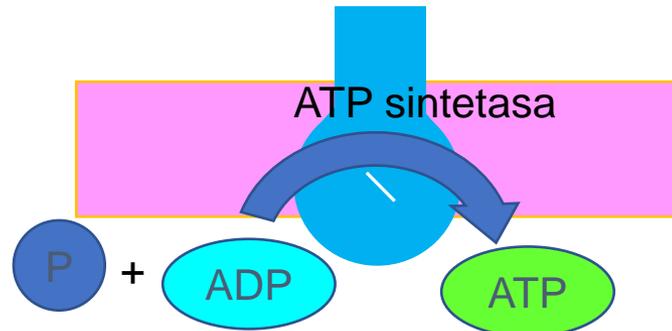


Se consideran tres tipos de fosforilación.

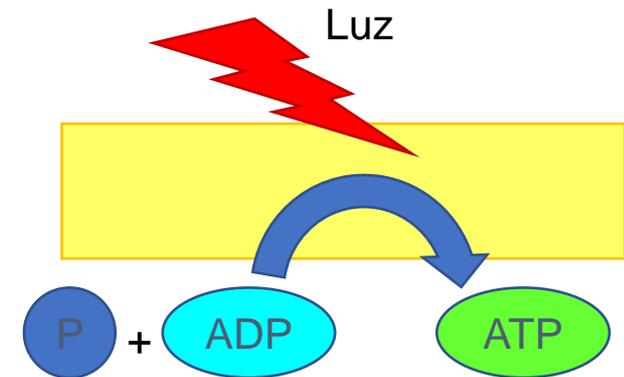
A) Fosforilación a nivel de sustrato, aquella en la que un fosfato presente en una molécula (sustrato fosforilado) es transferido al ADP.



B) Fosforilación oxidativa, se denomina así al proceso de generar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, mediante la fuerza motriz de protones creada a partir de compuestos químicos.



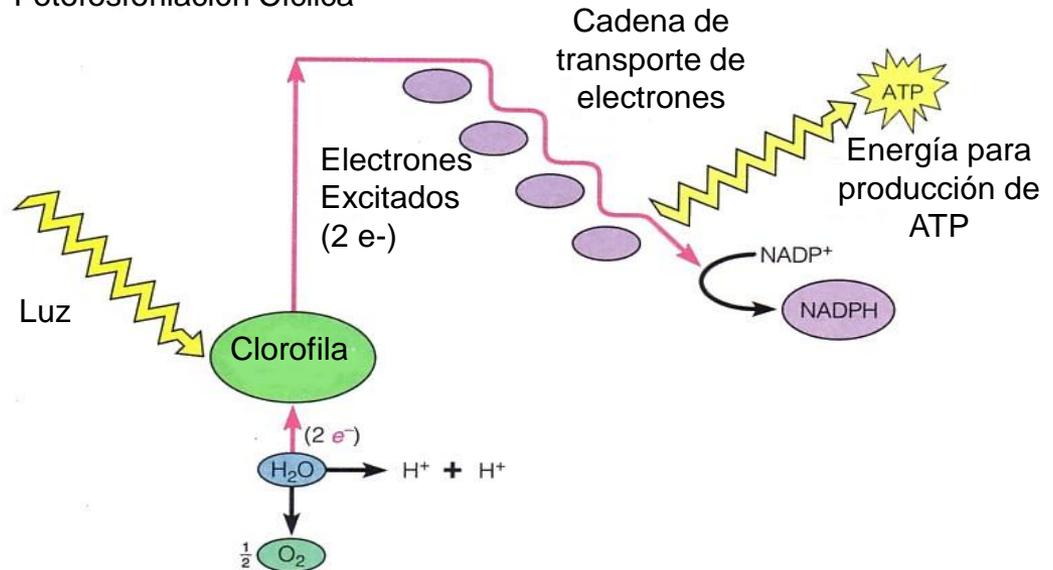
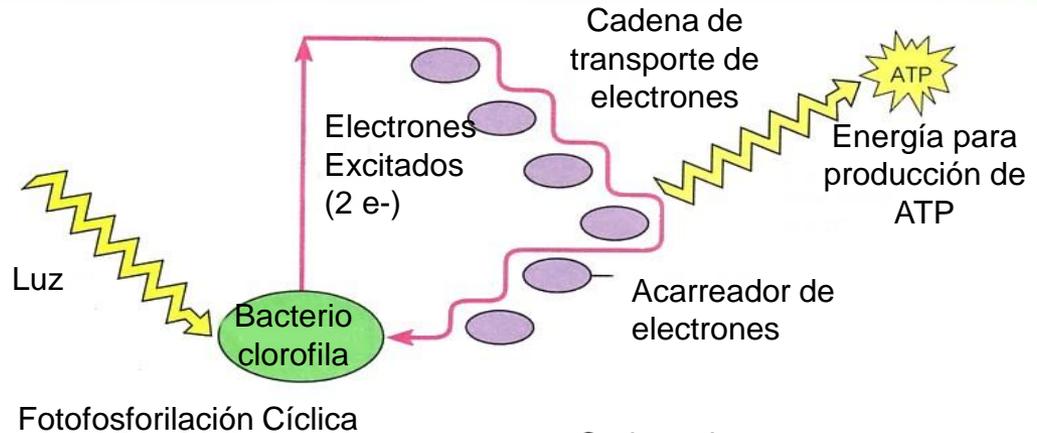
C) Fotofosforilación, funciona igual que la f. oxidativa, pero depende de la luz y las moléculas aceptoras de fotones. También se usa una fuerza motriz de protones.



FOTOSÍNTESIS. Fase luminosa.

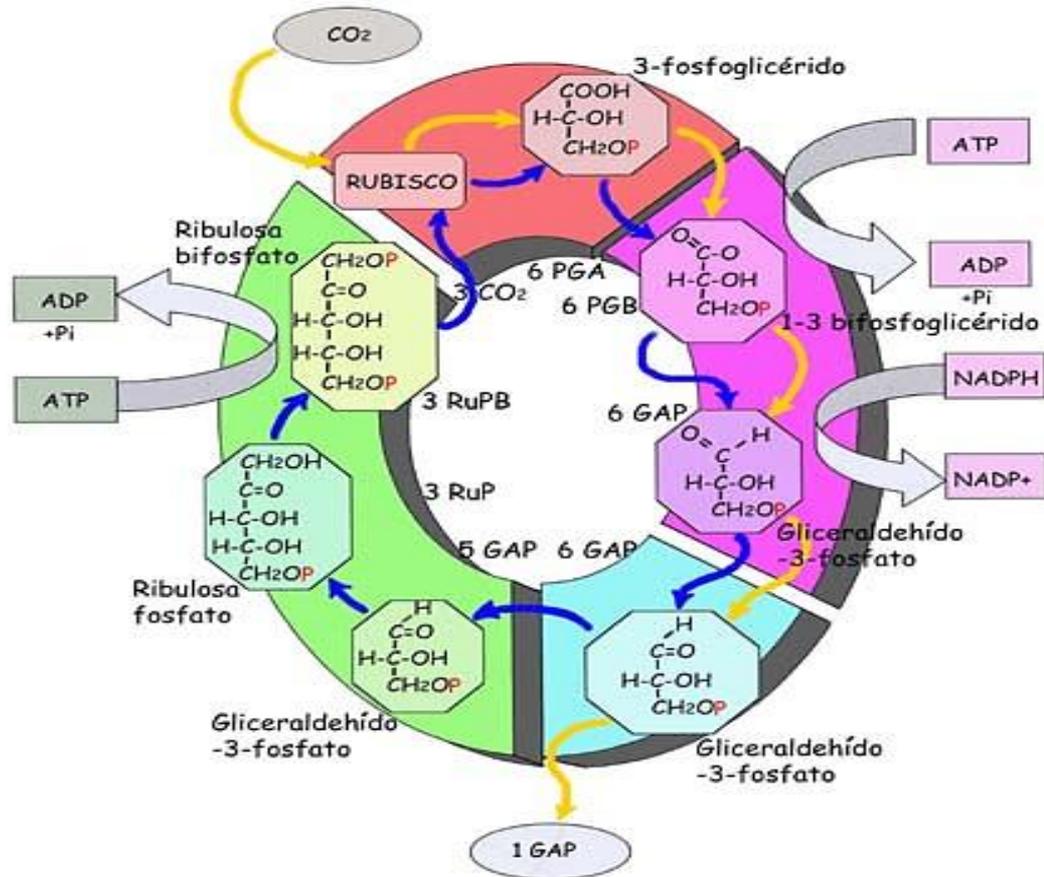
a) Bacterias fotosintéticas (rojas y verdes del azufre y no del azufre): fotosíntesis anoxygenic (no hay liberación de oxígeno), bacterioclorofila, es un sistema cerrado por tener fotofosforilación cíclica.

b) Cianobacterias, algas y plantas: fotosíntesis oxigénica (se libera oxígeno), clorofila, es un sistema abierto donde el donador de electrones es el agua. Aquí se llama al sistema fotofosforilación no cíclica.



FOTOSÍNTESIS. Fase oscura

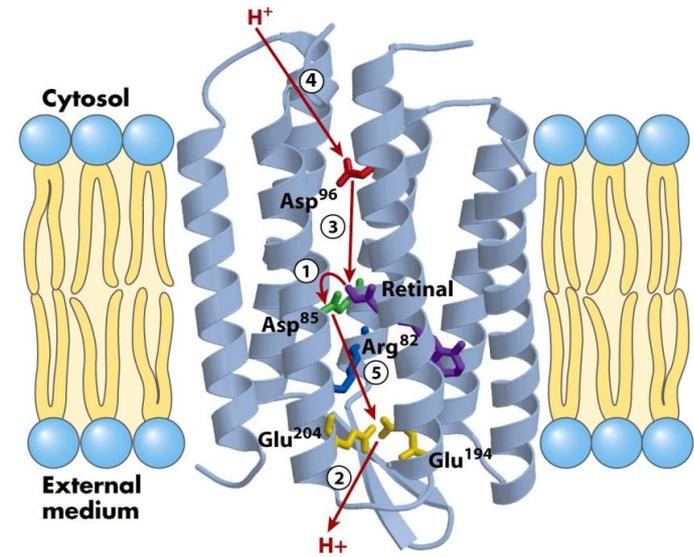
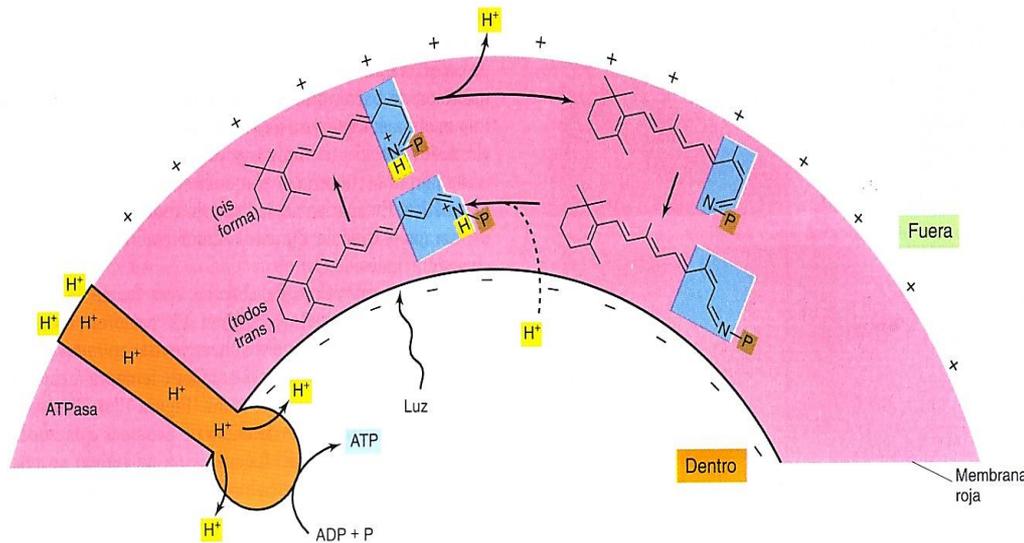
En la fase oscura se sintetizan los compuestos de carbono para terminar de almacenar la energía luminosa en energía química, al usar el ATP formado en la fase luminosa, junto con el NADPH_2 .



FOTOSÍNTESIS PARA GENERAR ATP SIN USAR CLOROFILA

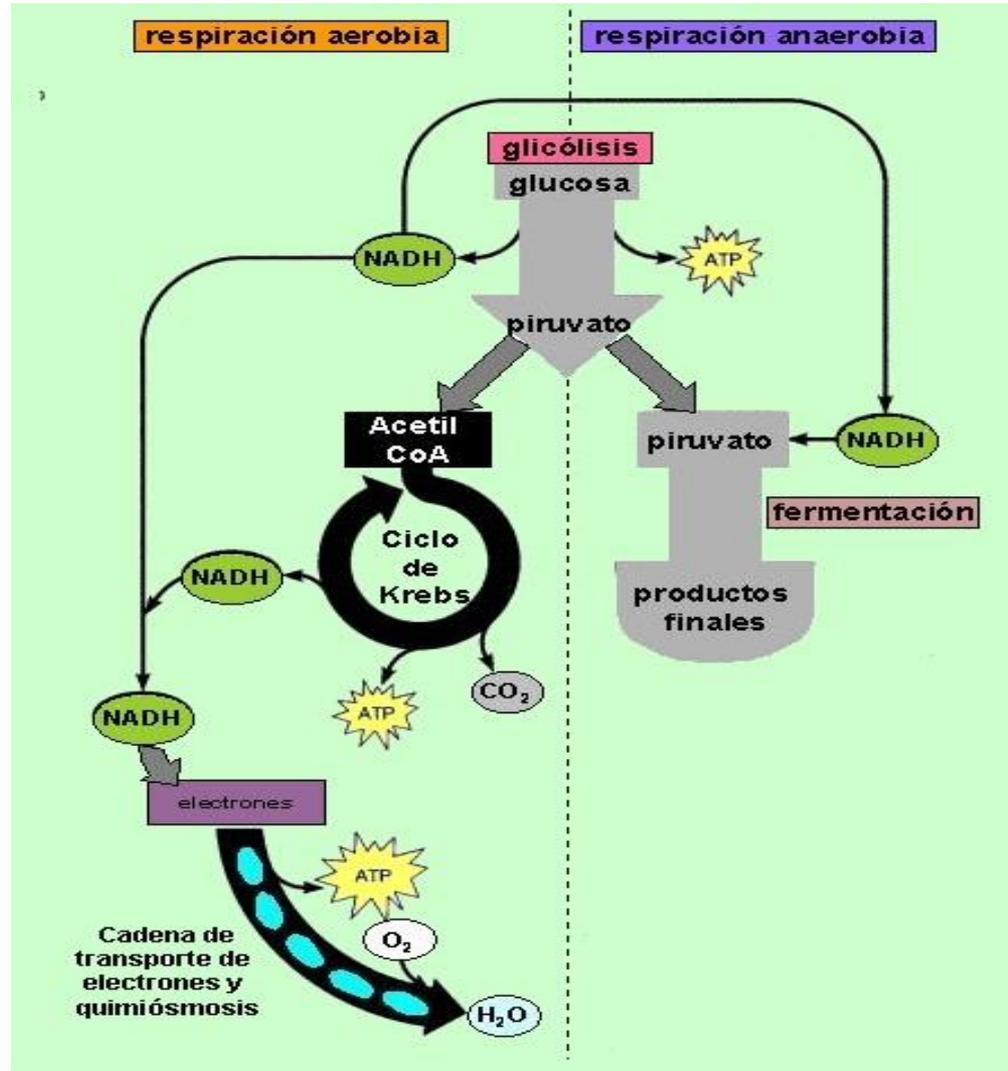
Existen archaeas con la capacidad de producir ATP con la ayuda de la luz, usando moléculas que absorben los fotones. No es del tipo de la clorofila.

La bacteriorrodopsina, encargada de absorber la luz para crear una bomba de protones. Funcionan con la frecuencia del verde del espectro visible. Se nombran así porque se parece a la rodopsina de la retina.



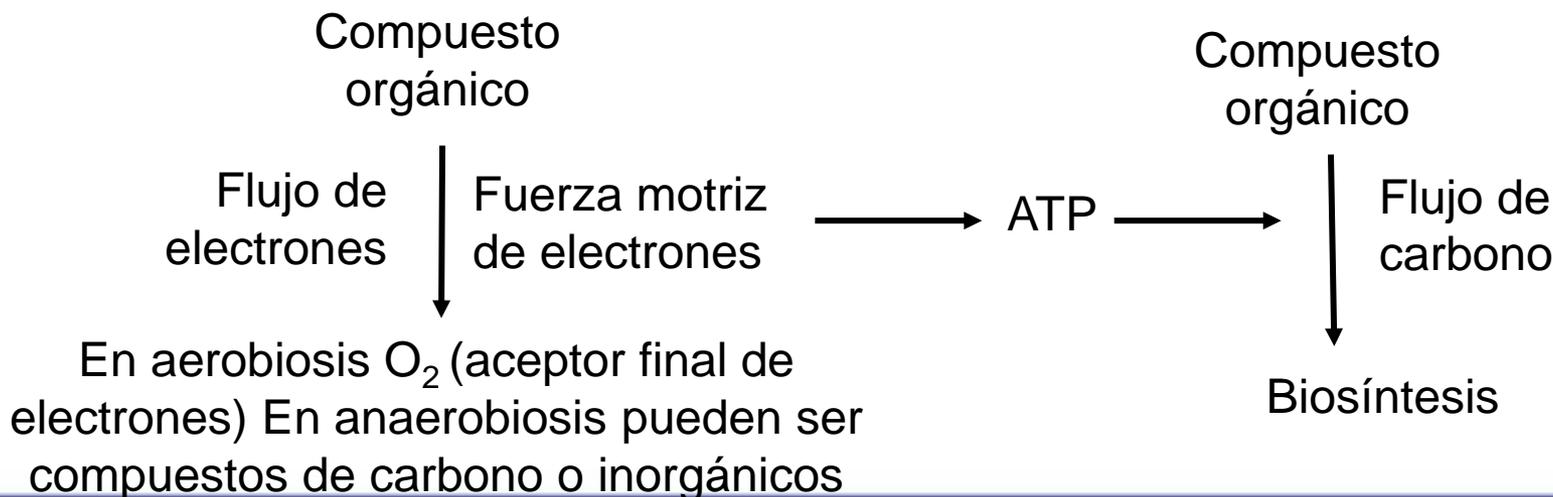
Ejemplo de esto son los halófilos extremos como *Halobacterium* sp.

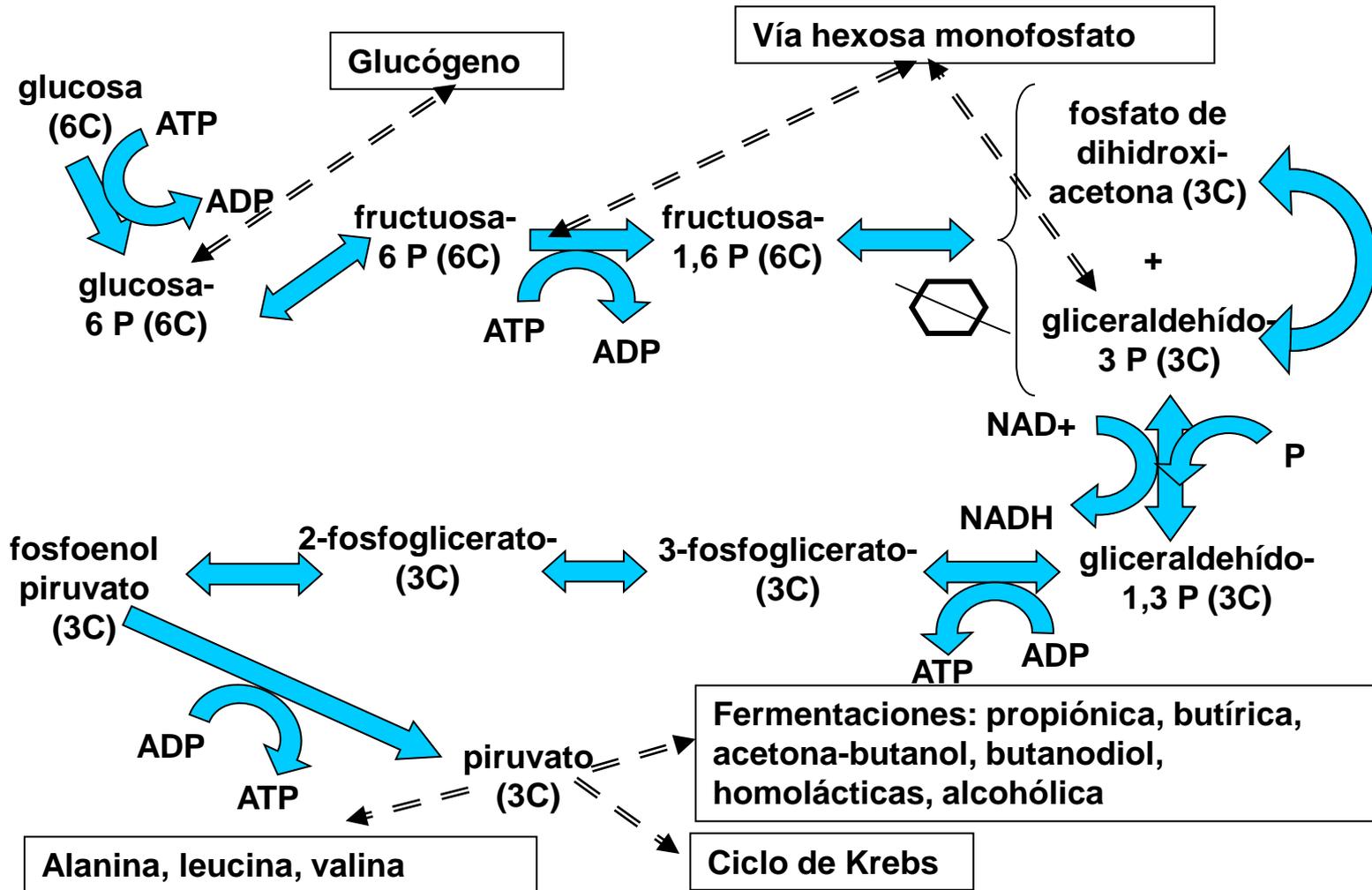
OBTENCIÓN DE ENERGÍA DE LOS QUIMIOHETERÓTROFOS

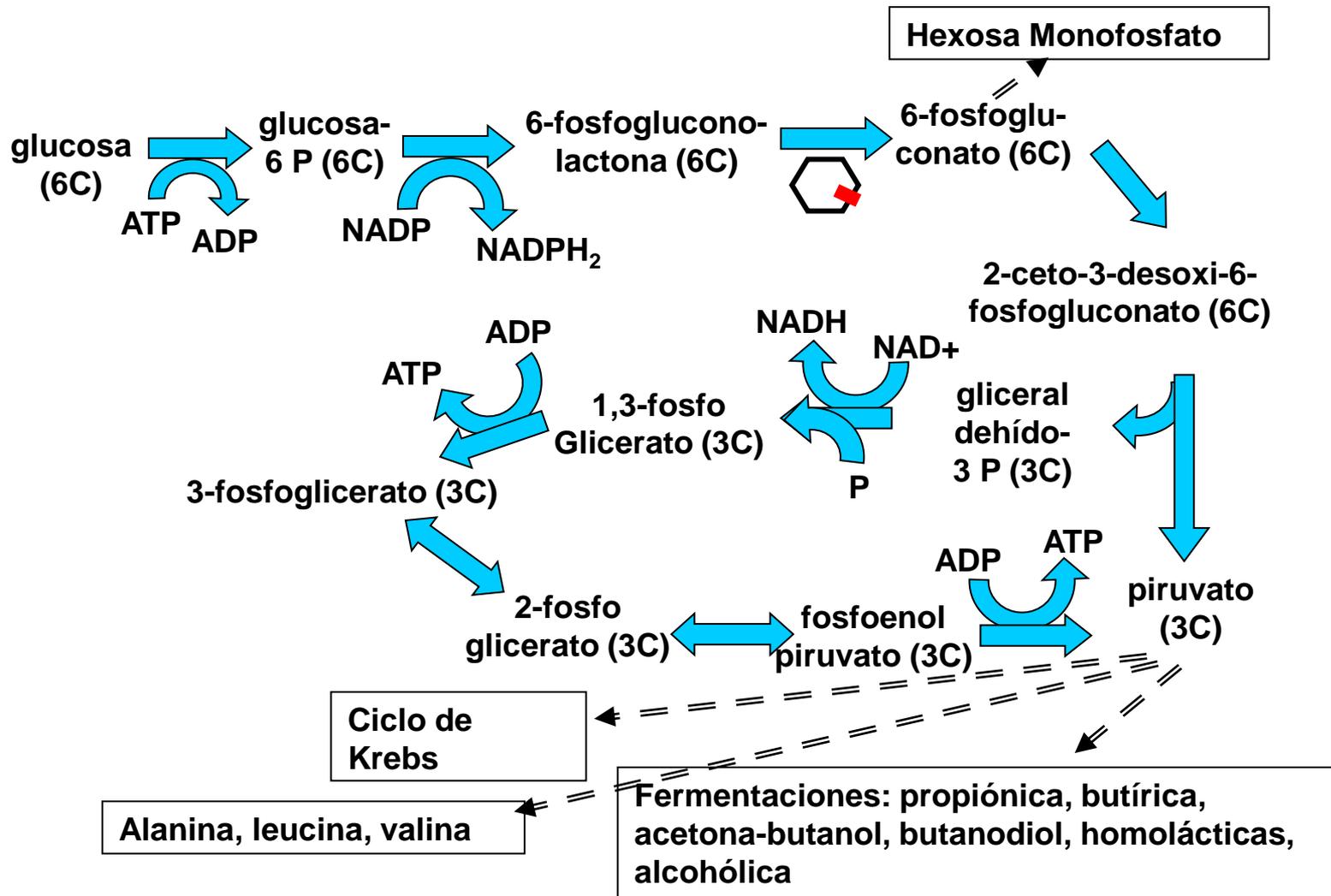


Uso de Carbohidratos

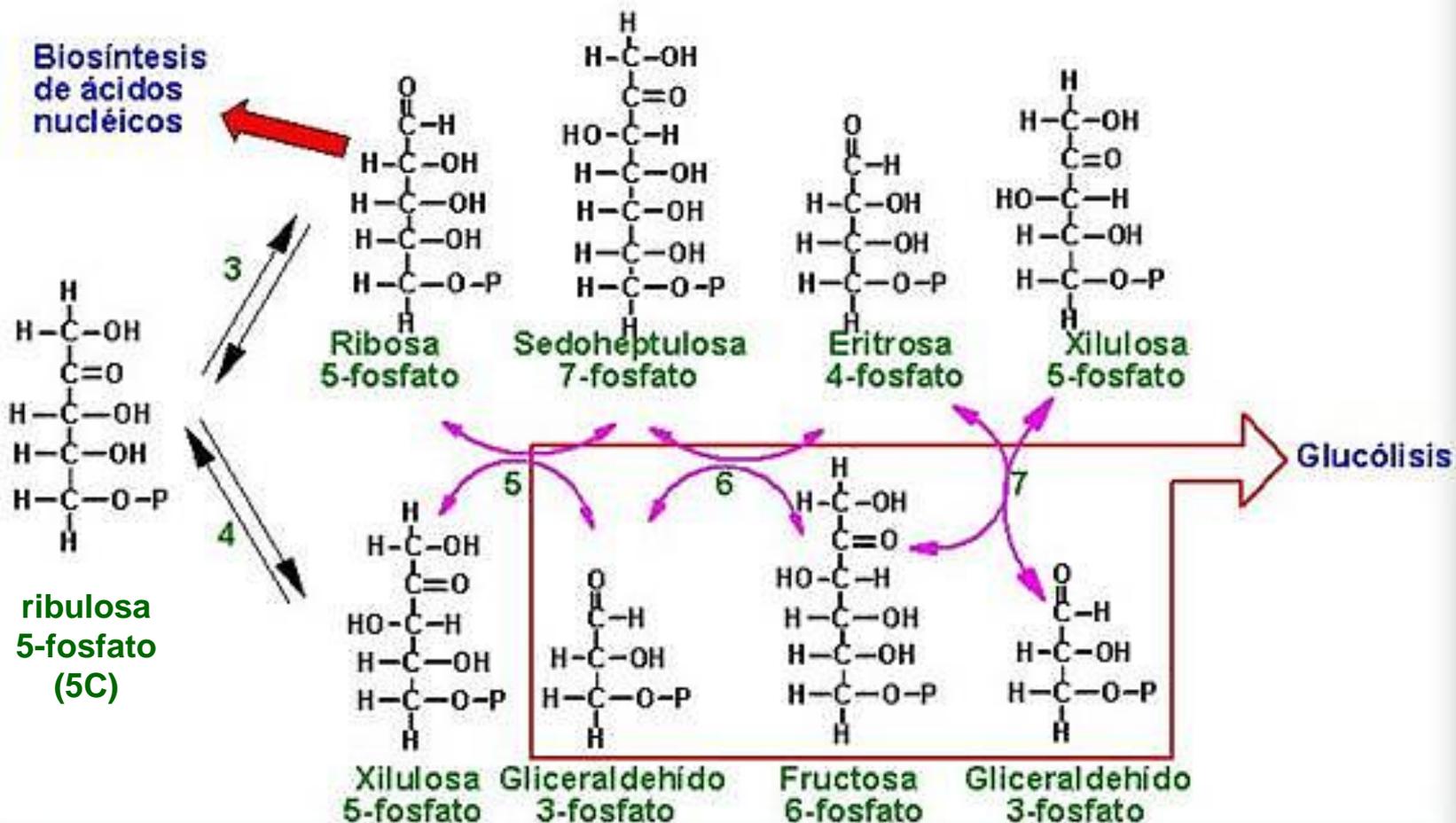
Vía metabólica	Características
Vía glucolítica de Embden-Meyerhof-Parnas	Fosforilación de la glucosa, formación de una pentosa y ruptura para obtener compuestos de 3 carbonos. Piruvato.
Degradación de glucosa por la vía Entner-Doudoroff	Fosforilación de la glucosa, apertura del anillo y formación de grupo ceto, ruptura para obtener compuestos de tres carbonos. Piruvato.
Vía de la Pentosas o Hexosa monofosfato	Obtención de azúcares de 5 carbonos por eliminación de un C de la glucosa. Uso para otras vías.







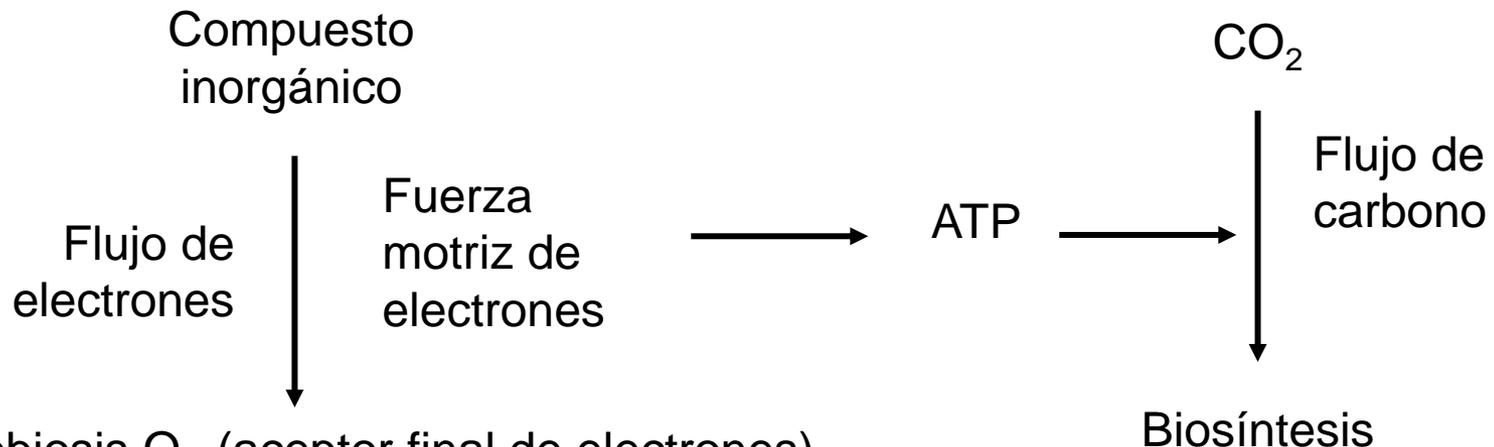
REACCIONES NO OXIDATIVAS (REVERSIBLES)



OBTENCIÓN DE ENERGÍA DE LOS QUIMIOAUTÓTROFOS

Los microorganismos quimioautótrofos (litótrofos) se presentan en muchas variedades. Hay los que utilizan compuestos de azufre (H_2S), hidrógeno (H_2) amoníaco (NH_3) y otras sustancias para obtener la energía necesaria para su metabolismo. De manera general usan reacciones de óxido reducción de compuestos inorgánicos para generar el ATP, y posteriormente fijan el CO_2 para producir sus compuestos de carbono.

Esquema general del metabolismo de un quimioautótrofo:



En aerobiosis O_2 (aceptor final de electrones).
En anaerobiosis compuestos inorgánicos

(Obtención de energía por consumo de compuestos o sustancias)

RESPIRACIÓN

Proceso metabólico en el cual la célula obtiene la energía de los compuestos químicos, para generar ATP que será utilizado en otros procesos metabólicos.

Respiración aerobia: Uso del oxígeno como aceptor final de electrones, para liberar la energía de los compuestos de carbono, (u otros compuestos)

Respiración anaerobia: Uso de aceptores inorgánicos, aunque también orgánicos para obtener energía de los nutrientes

Fermentación: Respiración anaerobia en la que el aceptor final de electrones es un compuesto orgánico

PRODUCCIÓN DE ATP: Respiración aeróbica de una célula procariote a partir de una molécula de glucosa.

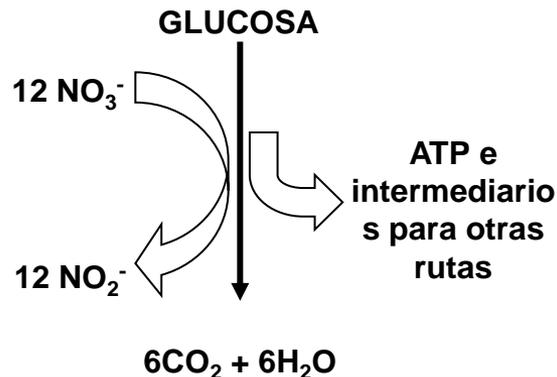
Fuente	ATP obtenido
Glicólisis 1. Oxidación de la glucosa a ácido pirúvico 2. Producción de 2 NADH	2ATP (fosforilación a nivel de sustrato) 6 ATP (fosforilación oxidativa en la cadena de transporte de electrones)
Paso preparatorio 1. La formación de acetil coenzima A da 2NADH	6 ATP (fosforilación oxidativa en la cadena de transporte de electrones)
Ciclo de Krebs 1. Oxidación de Succinil CoA a ácido succínico 2. Producción de 6NADH 3. Producción de 2FADH	2GTP (equivalente al ATP, fosforilación a nivel de sustrato) 18 ATP (fosforilación oxidativa en la cadena de transporte de electrones) 4 ATP (igual que el anterior)



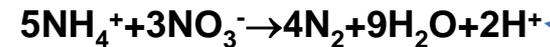
RESPIRACIÓN ANAERÓBICA

Sustrato:	Compuestos orgánicos (pueden ser azúcares) o compuestos inorgánicos
Aceptor inorgánico de electrones	NO_3^- , SO_4^{2-}
Productos finales	NO_2^- , SO_3^{2-}
Energía invertida	Según ruta
Energía obtenida	Según ruta
Energía neta	Según ruta
Enlace a otras rutas	Productos finales a ninguna

Respiración anaeróbica con un sustrato orgánico y un aceptor inorgánico para generar ATP

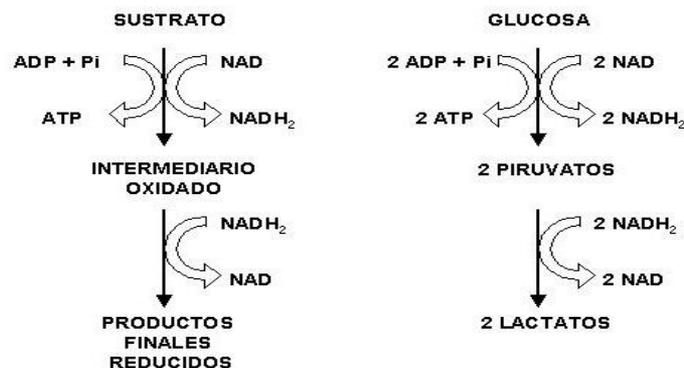


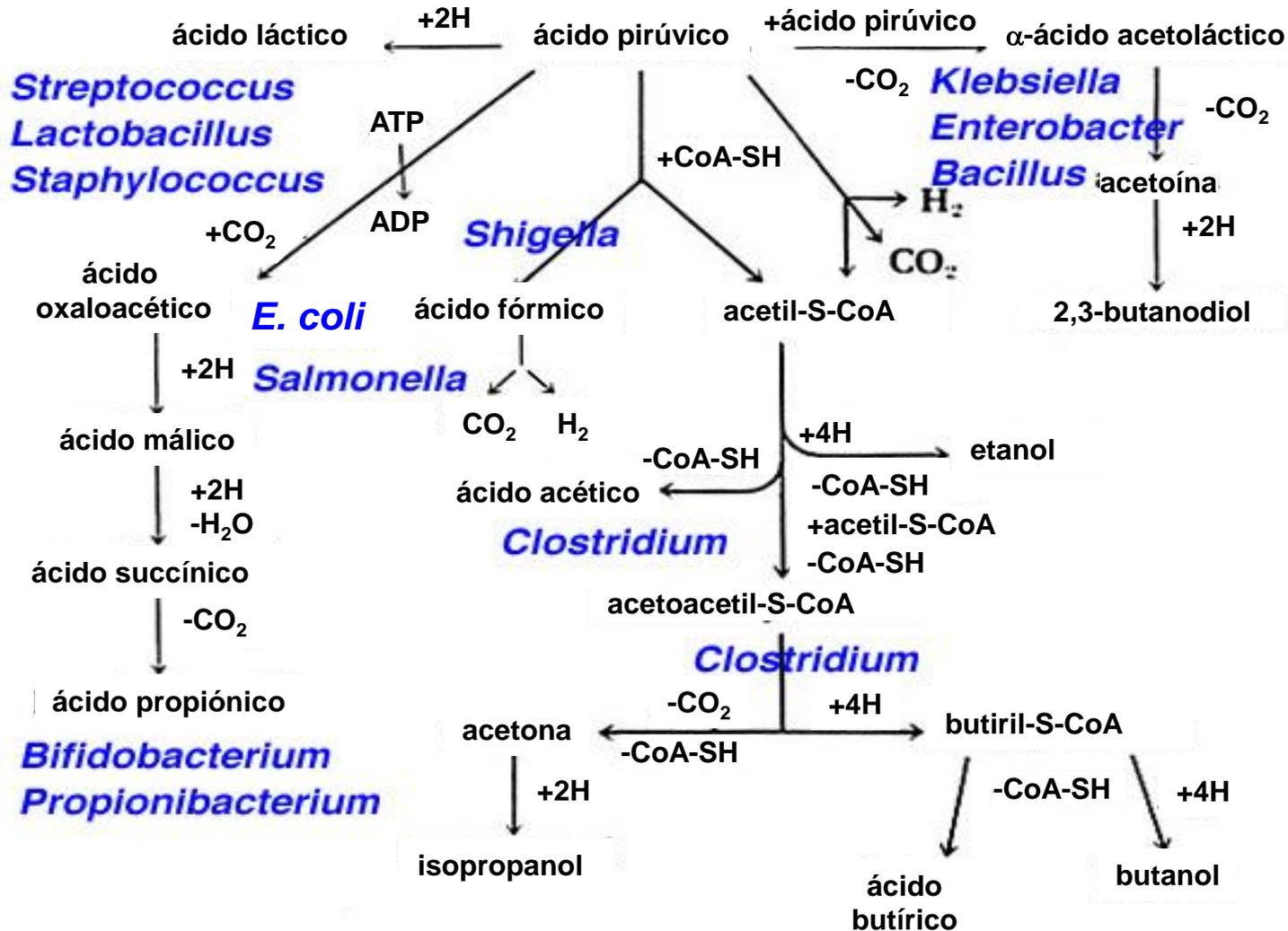
Ejemplo de respiración anaeróbica usando sustratos inorgánicos y aceptores inorgánicos para generar ATP



(Este se usa en la producción de ATP)

Sustrato:	Glucosa o azúcares
Intermediarios importantes:	piruvato (otros según ruta)
Productos finales (El aceptor es un compuesto orgánico, para cada producto hay una vía fermentativa diferente)	ácido láctico, 2,3-butanodiol, ácido fórmico, ácido acético, acetona, isopropanol, ácido butírico, butanol
Energía invertida	Según ruta
Energía obtenida	Según ruta
Energía neta	Según ruta
Enlace a otras rutas	Productos finales a ninguna



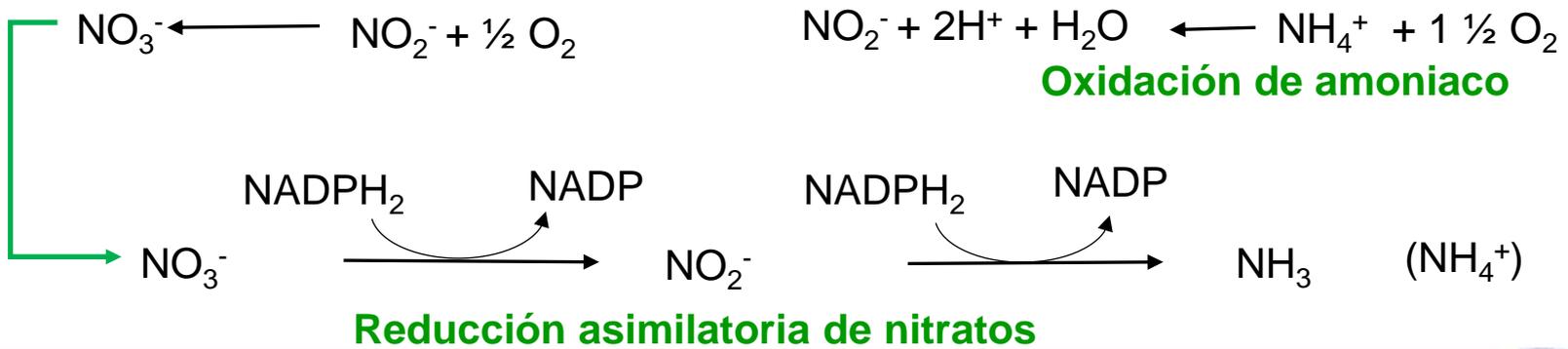
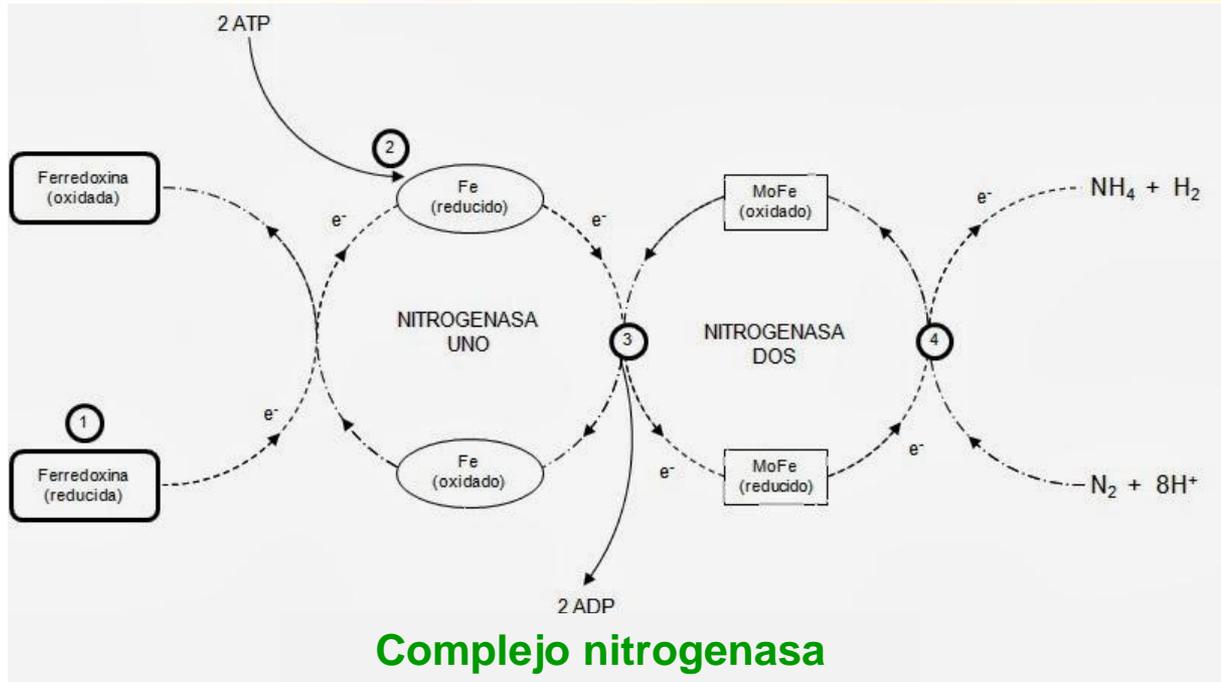


03.3 Asimilación y uso del nitrógeno.

USO DEL NITRÓGENO SEGÚN EL TIPO DE MICROORGANISMOS

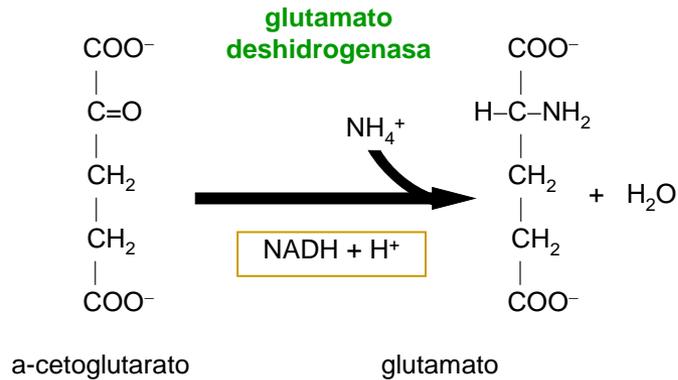
Tipo de microorganismo	Fijación de nitrógeno	Asimilación de amoniac	Transaminación
Fijador de Nitrógeno	Si	Si	Si
No fijador que usa nitrógeno inorgánico	No	Si	Si
No fijador que usa nitrógeno orgánico exclusivamente	No	No	Si

FIJACIÓN DEL NITRÓGENO.

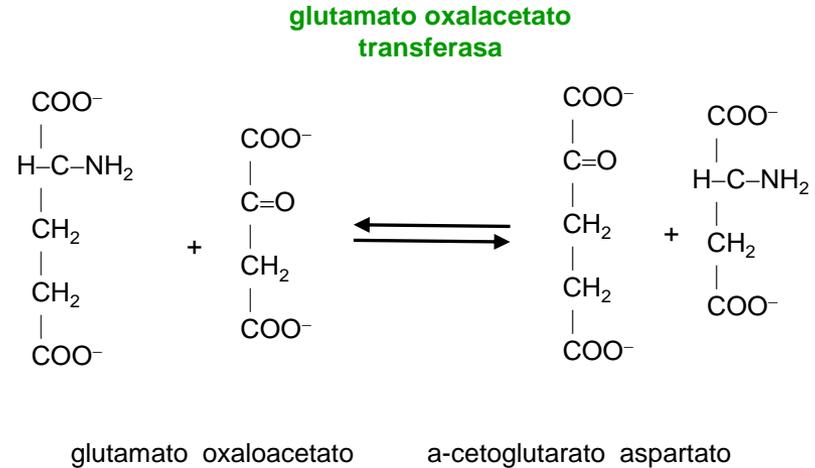


ASIMILACIÓN Y TRANSAMINACIÓN DE NITRÓGENO.

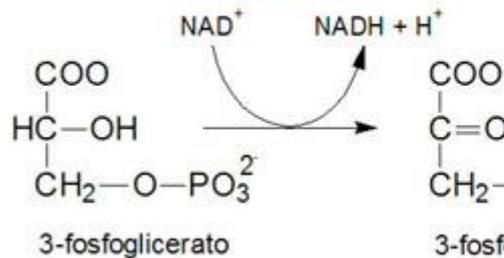
ASIMILACIÓN



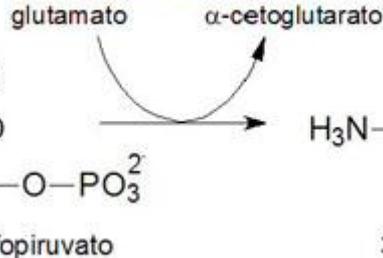
TRANSAMINACIÓN



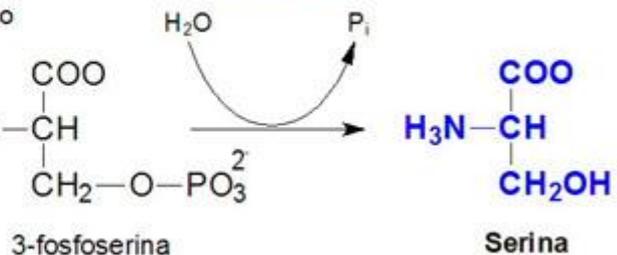
fosfoglicerato deshidrogenasa deshidrogenasa



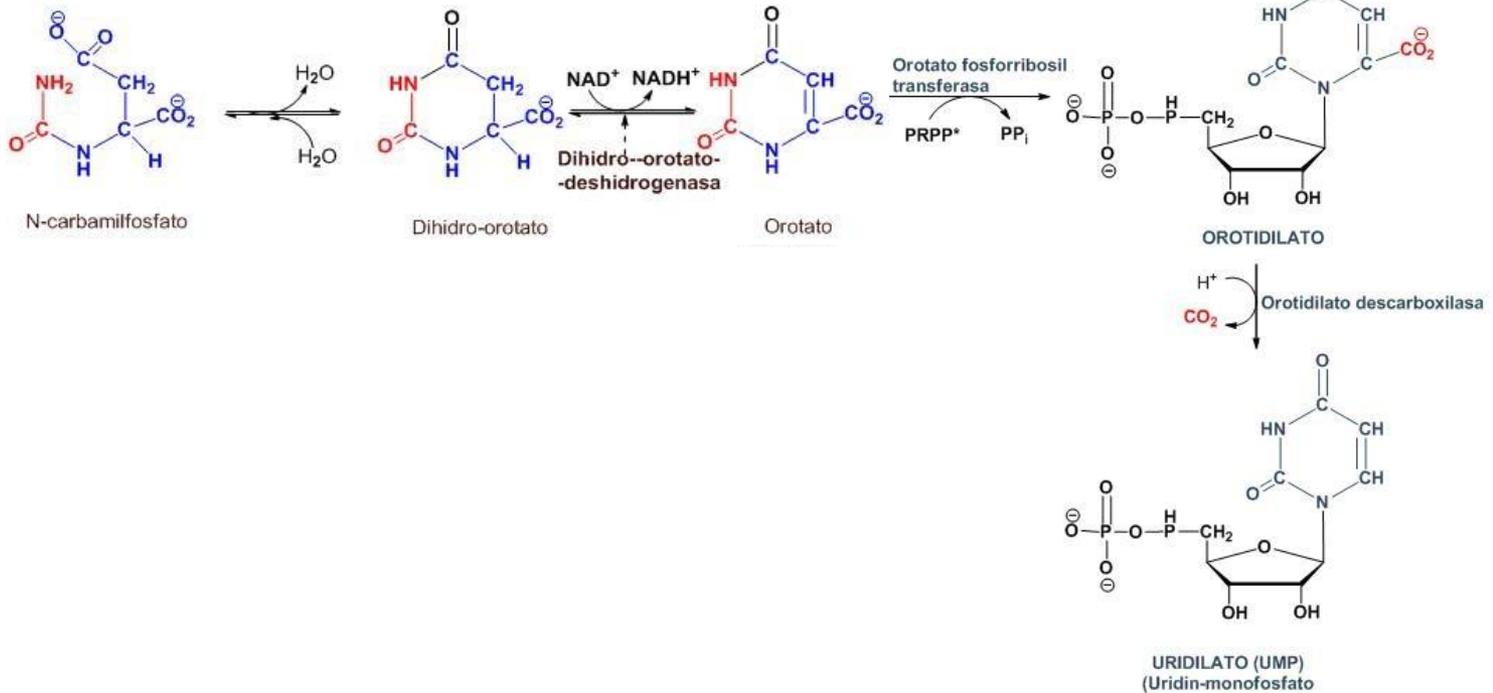
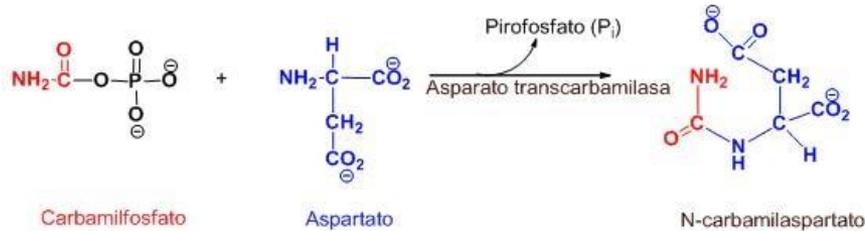
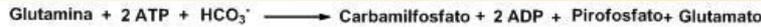
aminotransferasa



fosfatasa



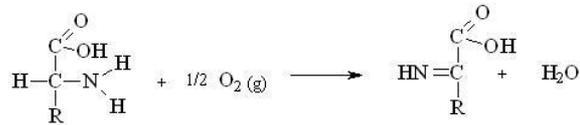
SÍNTESIS DE COMPUESTOS COMPLEJOS.



*: PRPP: Fosforribosil pirofosfato



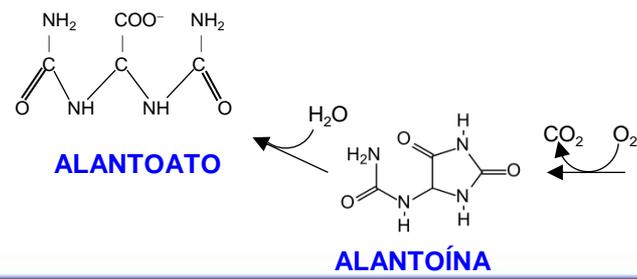
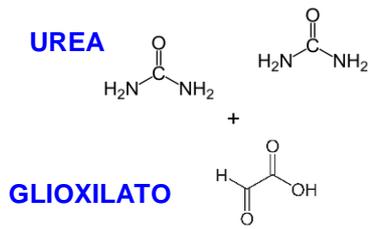
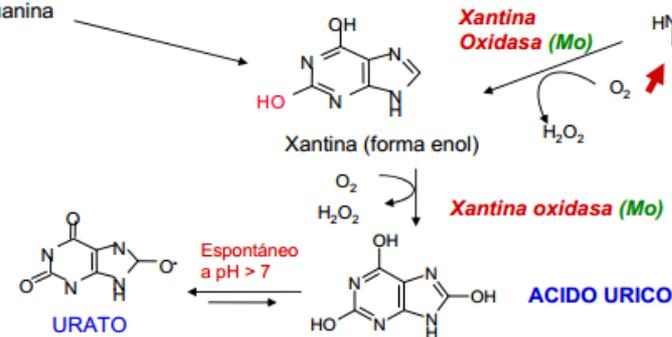
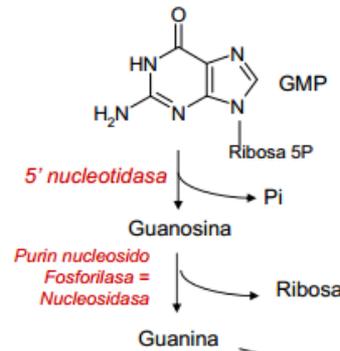
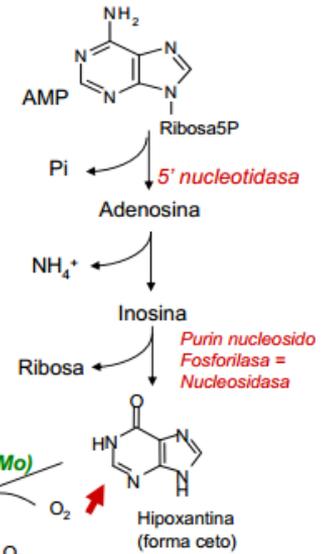
DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS NITROGENADOS.

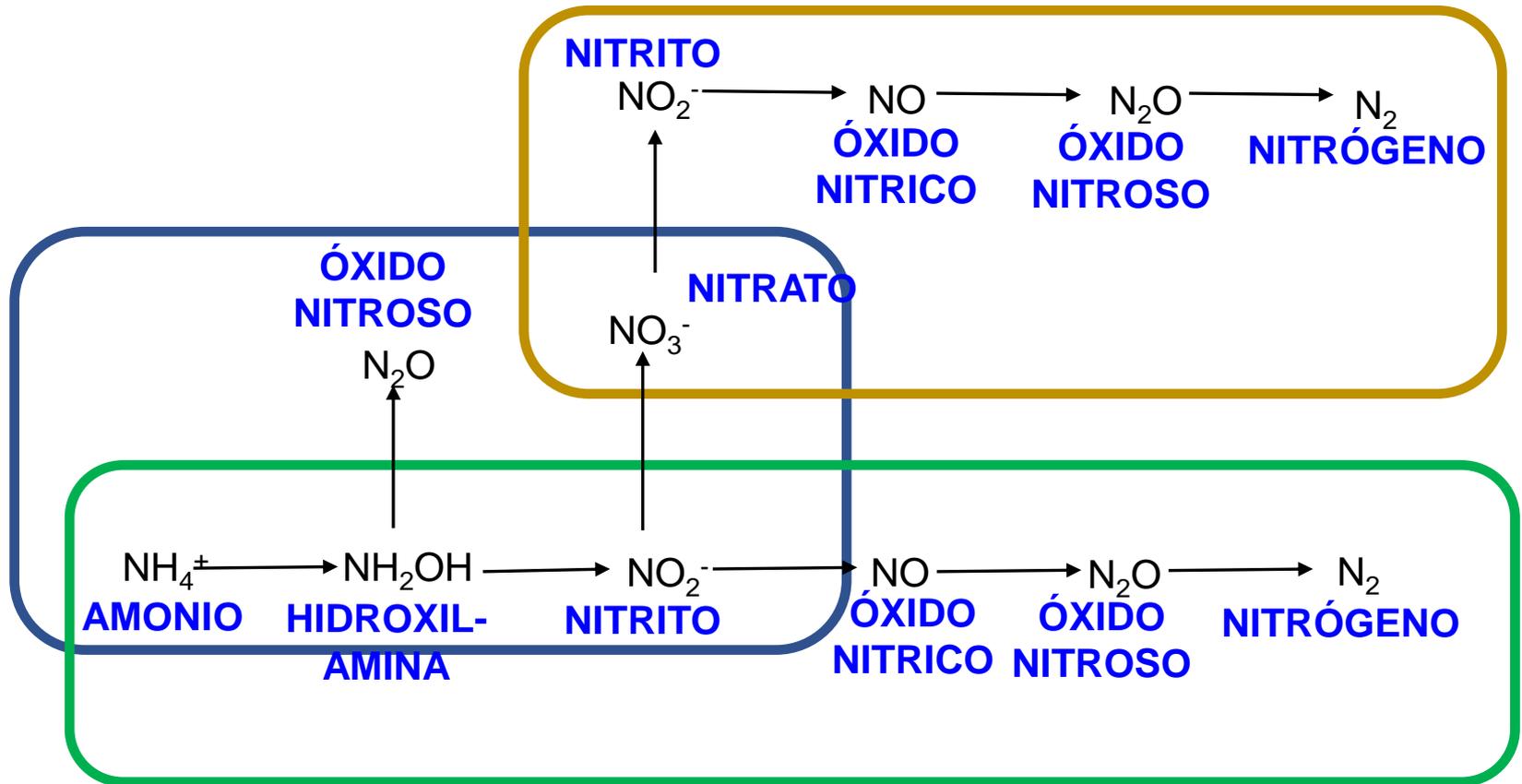


Desaminación de aminoácidos

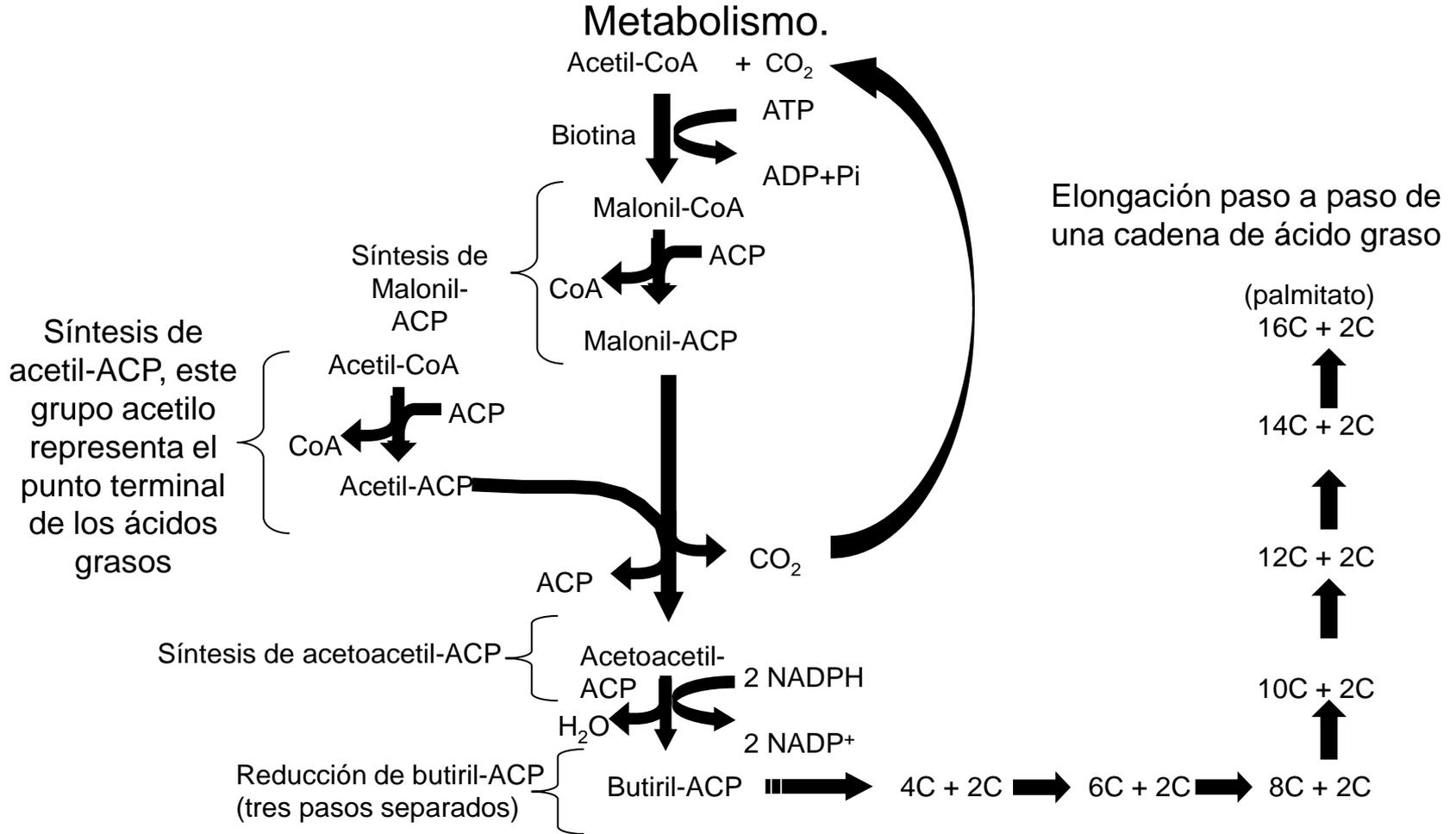


Degradación de nucleótidos de purina

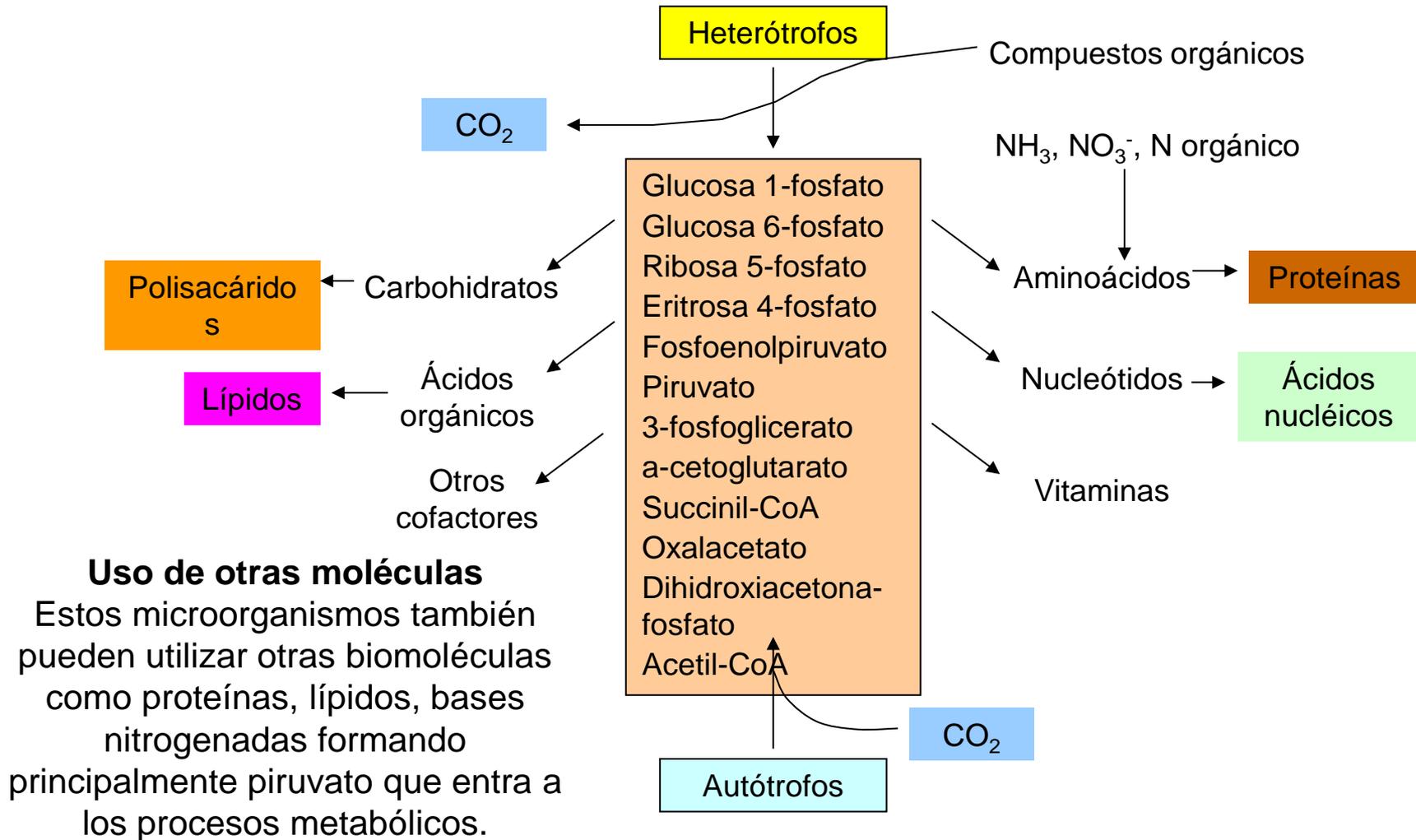




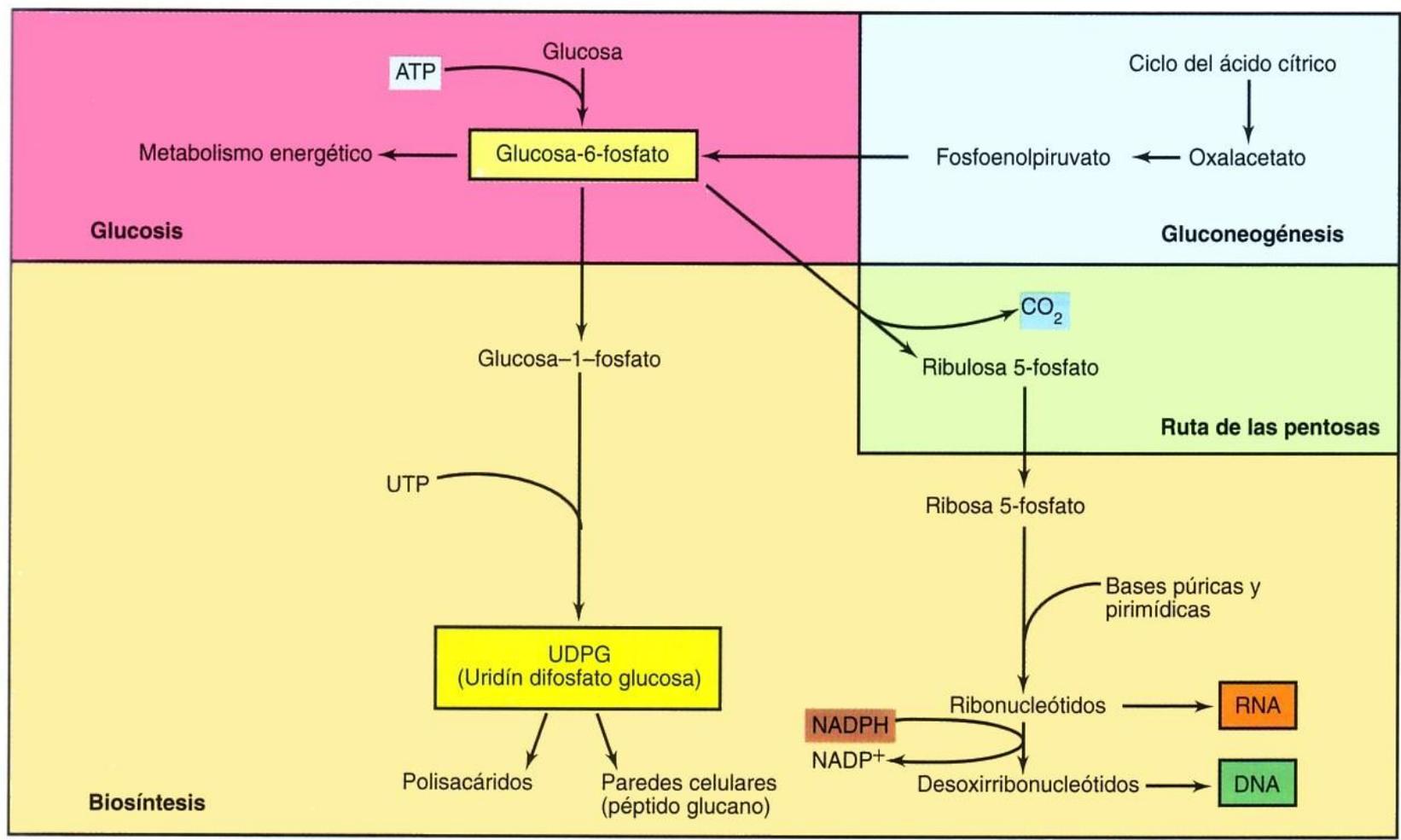
Para reserva alimenticia o síntesis de membranas



INTERMEDIARIOS IMPORTANTES EN EL METABOLISMO DE LA CÉLULA



RESUMEN GENERAL DEL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y OTRAS BIOMOLÉCULAS.



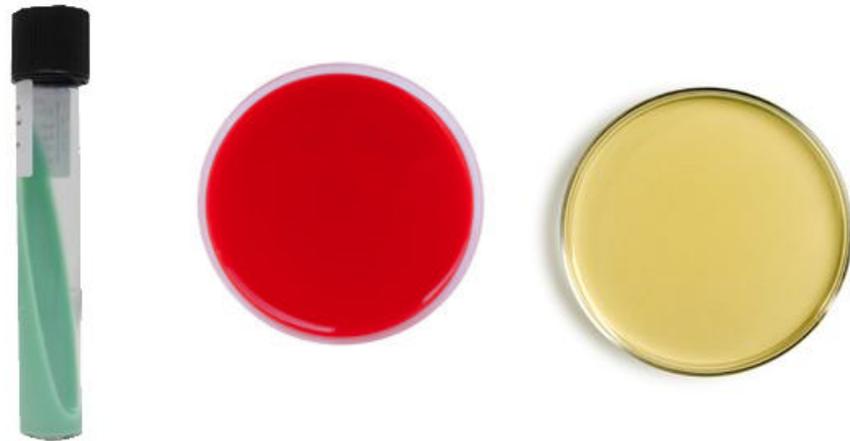
03.4 Medios de cultivo: clasificación, diseño y aplicaciones.

MEDIOS DE CULTIVO

Mezcla de agua con sustancias orgánicas y/o inorgánicas que permiten el desarrollo de los microorganismos “in vitro”

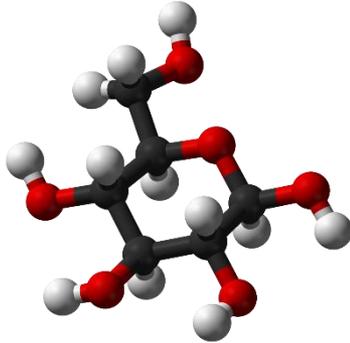
El propósito de los medios de cultivo es proporcionar los nutrientes necesarios para que el microorganismo pueda crecer y reproducirse en el laboratorio, con diversos fines como investigación, identificación, diagnósticos o producción

Pueden clasificarse por:
composición,
estado físico,
aplicación o uso.

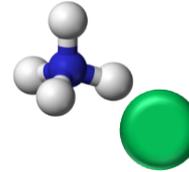


CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO POR COMPOSICIÓN

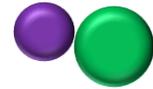
- Sintéticos



Glucosa QP



NH₄Cl



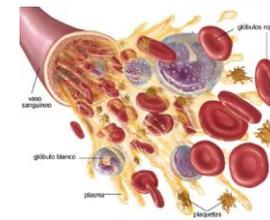
NaCl

- Naturales o complejos

Agar Papa: Mezcla de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, lípidos, sales minerales, etc.



Agar Sangre: Al medio base se agrega sangre de carnero.



CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO POR ESTADO FÍSICO

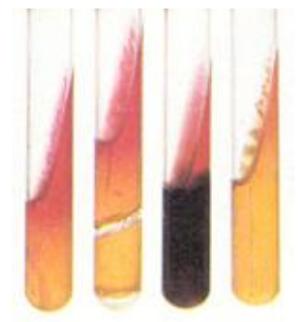
Líquidos



Semisólidos



Sólidos



Agentes gelificantes

Agar-agar
(Carbohidrato)



Grenetina
(Proteína)



Sílica Gel
(SiO₂)



CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO POR APLICACIÓN O USO

Aplicación	Ejemplo
•Generales	Caldo Nutritivo, Caldo Cerebro Corazón Agar, Agar Tripticasa Soya (TSA)
•Selectivos	Agar Eosina Azul de Metileno (EMB), Agar Endo, Manitol Sal Agar (MSA), Agar Cetrimida, Agar Verde Brillante
•De enriquecimiento	Stuart, Agar 110
•Enriquecidos	Agar Sangre, Agar Chocolate, Agar Cerebro Corazón
•Diferenciales	Eosina Azul de Metileno, Manitol Sal Agar
•Cuantificación de microorganismos	Agar Papa Dextrosa, Agar Cerebro Corazón, Agar dextrosa y triptona
•De valoración (base)	Agar Müller Hinton
•Para caracterización	Bioquímicas (Caldo triptona, Medio SIM, Agar Almidón, Medio O/F)
•De mantenimiento	Leche Descremada

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE UNA CÉLULA PROCARIÓTICA

Molécula	% peso seco	Moléculas por célula	Clases diferentes
MACROMOLÉCULAS:			
Proteínas	55	2,350,000	~1850
Polisacáridos	5	4,300	2
Lípidos	9.1	22,000,000	4
ADN	3.1	2.1	1
ARN	20.5	255,500	~600
Total de moléculas	96	24,610,000	~2500
MONÓMEROS:			
Aminoácidos y precursores	0.5	---	~100
Azúcares y precursores	2	---	~50
Nucleótidos y precursores	0.5	---	~200
Total de monómeros	3.5	---	~350
Iones inorgánicos	1	---	18

EJEMPLO DE REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES EN MEDIOS DE CULTIVO

Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Sales Inorgánicas	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Carbono orgánico	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Nitrógeno inorgánico	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
un aminoácido		Sí	Sí		
dos o más aminoácidos				Sí	Sí
una vitamina			Sí	Sí	
dos o más vitaminas					Sí

SUSTANCIAS Y/O COMPUESTOS COMÚNMENTE EMPLEADOS EN MEDIOS DE CULTIVO

Elemento	Forma habitual en que se encuentra	Forma utilizada en medios de cultivo
Carbono (C)	CO ₂ , compuestos orgánicos	Glucosa, malato, acetato, piruvato, peptonas, lípidos
Hidrógeno (H)	H ₂ O, compuestos orgánicos	H ₂ O, compuestos orgánicos
Oxígeno (O)	H ₂ O, O ₂ , compuestos orgánicos	H ₂ O, O ₂ , compuestos orgánicos
Nitrógeno (N)	NH ₃ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , compuestos orgánicos nitrogenados	Inorgánicos: NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂ Orgánicos: aminoácidos bases nitrogenadas, otros compuestos orgánicos con N
Fósforo (P)	PO ₄ ³⁻	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
Azufre (S)	H ₂ S, S ²⁻ , SO ₄ ²⁻ compuestos orgánicos azufrados	Na ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, compuestos orgánicos azufrados
Potasio (K)	K ⁺	KCl, KH ₂ PO ₄
Magnesio (Mg)	Mg ²⁺	MgCl ₂ , MgSO ₄
Sodio (Na)	Na ⁺	NaCl
Calcio (Ca)	Ca ²⁺	CaCl ₂
Hierro (Fe)	Fe ²⁺ o Fe ³⁺ , o FeS	FeCl ₃ , FeSO ₄ , soluciones de Fe con EDTA

MEDIO PARA EL CULTIVO DE LACTOBACILOS

Caseína hidrolizada	5 g	Uracilo	10 mg
Glucosa	10 g	Riboflavina	500 µg
Solución A	10 mL	Tiamina	500 µg
Solución B	5 mL	Pantotenato	500 µg
L-Asparagina	250 mL	Niacina	500 µg
L-Triptófano	50 mg	Piridoxamina	200 µg
L-Cistina	100 mg	Piridoxal	100 µg
DL-Metionina	100 mg	Piridoxina	200 µg
Cisteína	100 mg	Inositol	10 µm
Citrato de amonio	2 g	Colina	10 µm
Acetato de sodio (anhidro)	6 g	Ác. paraaminobenzoico	200 µg
Adenina	10 mg	Biotina	5 µg
Guanina	10 mg	Ácido fólico (sintético)	3 µg
Xentina	10 mg	Agua destilada	1000 mL

Solución A. K_2HPO_4 y KH_2PO_4 , 25 g de cada una, en agua destilada hasta completar 250 mL.

Solución B. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5g; $MnSO_4 \cdot 2H_2O$, 2.0g; NaCl, 0.5 g; y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 g. Disolver en agua destilada hasta un volumen de 250 mL

Medio sintético

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 g
Glucosa	5 g
NaCl	5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
K_2HPO_4	1 g
H_2O destilada	1000 mL

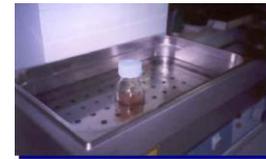
Medio natural o complejo

Extracto de carne	3 g
Peptona de carne	5 g
H_2O destilada	1000 mL

DISEÑO DE MEDIOS DE CULTIVO: Es el desarrollo de nuevos medios y se basa en las características nutricionales y bioquímicas de los microorganismos a estudiar. En función de estas características se proponen fuentes de energía, carbono, nitrógeno, oligonutrientes, factores de crecimiento, pH y otros parámetros. Posteriormente se estandariza para utilizarse en investigación o uso comercial.



PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO: Es la elaboración de un medio de cultivo, que ya ha sido desarrollado y simplemente se siguen las indicaciones del fabricante o del investigador. Se agrega la cantidad señalada en la formulación y se añade la cantidad de agua indicada. Se ajusta el pH y otras características para tener el medio de cultivo listo para utilizarse.



03) METABOLISMO

03.5) CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA MICROBIANA.

La actividad metabólica de los microorganismos esta definida por factores genéticos y ambientales.

Factores genéticos: La información genética permitirá la producción de enzimas que utilizará en su metabolismo. Por lo tanto las rutas metabólicas están definidas por las enzimas que produzca el microorganismo y si no tiene el gen no habrá enzima. Por ejemplo: *Bacillus subtilis* tiene el gen que codifica para la amilasa, para degradar almidón, por lo que puede usar frutas y alimentos ricos en almidón como fuente de carbono en caso de estar en el ambiente. Si no hay almidón, no habrá síntesis de la enzima. A diferencia de *Escherichia coli*, quien no cuenta con el gen de la amilasa y no importa las condiciones en que se coloque, nunca expresará esta enzima.

Factores ambientales: las condiciones ambientales también tienen importancia en el metabolismo, ya que el entorno en que se encuentran los microorganismos podrá incidir en las vías metabólicas que utilice.

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA

El catabolismo y el anabolismo pueden presentar diversas vías que pueden ser útiles para caracterizar a los microorganismos.

Por ejemplo, las vías necesarias para el uso del nitrógeno

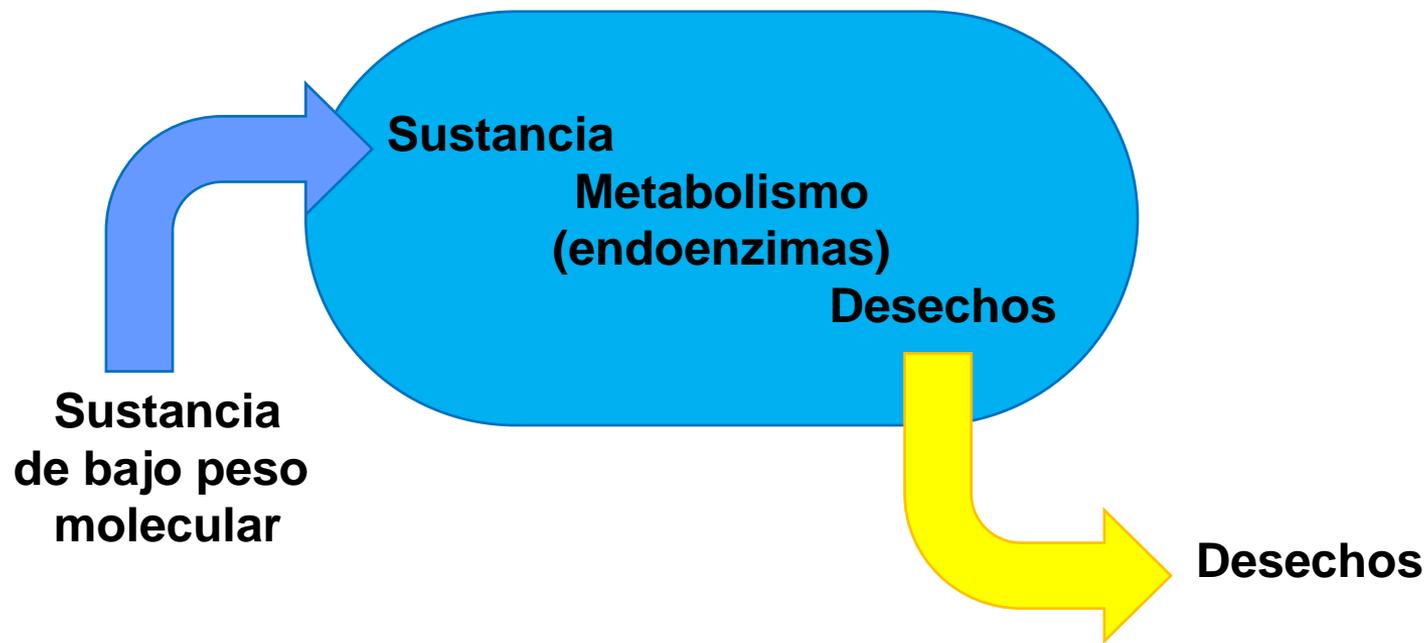
Los microorganismos fijadores de nitrógeno tienen las enzimas para convertir el N_2 atmosférico en nitrógeno inorgánico (por ejemplo NH_4^+)

Después de este paso el mismo microorganismo u otros organismos que cuenten con una enzima podrán asimilar el nitrógeno inorgánico y convertirlo en nitrógeno orgánico, al tomar un radical amonio e incorporarlo a un esqueleto de α -cetoácido.

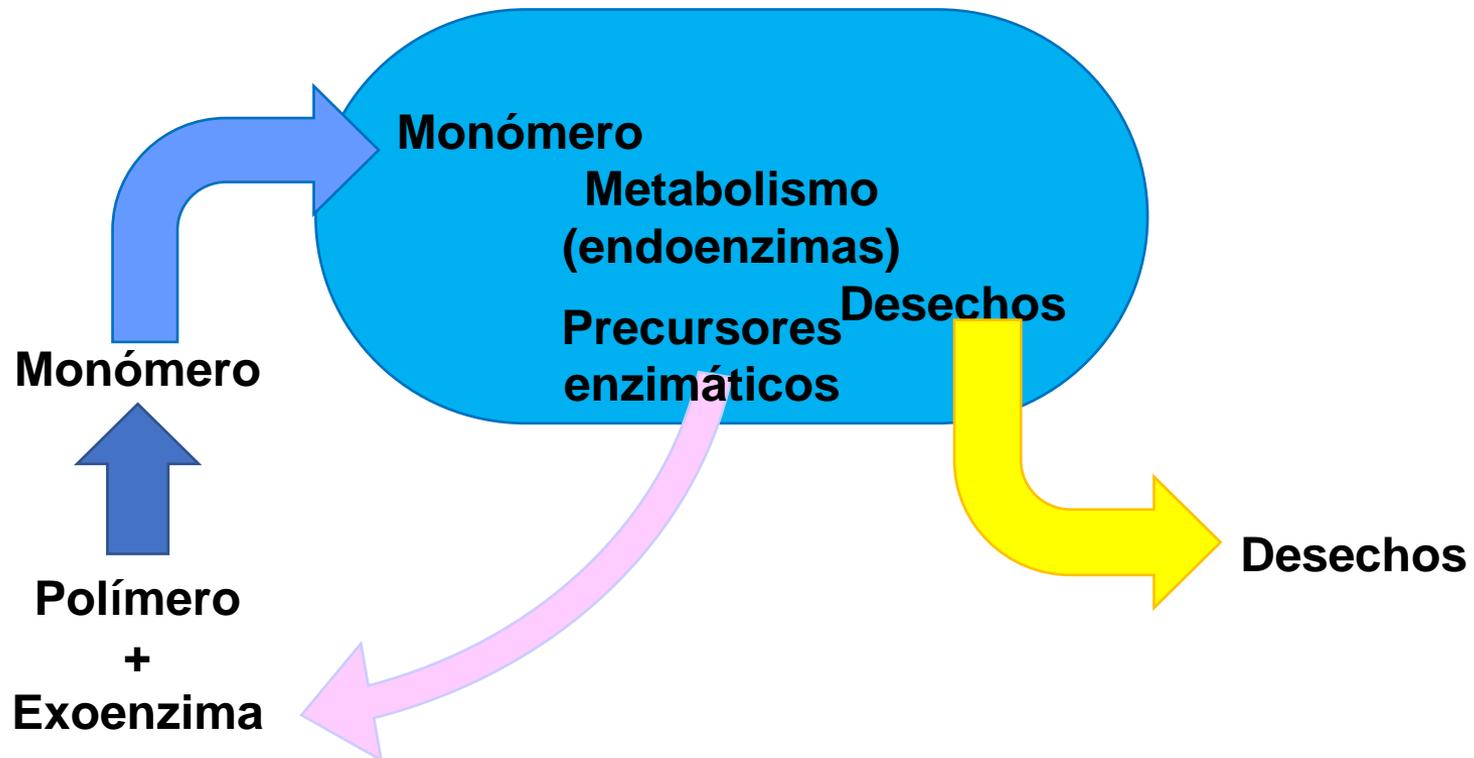
Un último proceso que pueden presentar la mayoría de los seres vivos es la transaminación, que consiste en pasar el grupo amino de un aminoácido a un α -cetoácido.

Las enzimas se encuentran en el interior de la célula y las sustancias son transportadas a través de la membrana por enzimas de transporte. Algunos autores llaman a estas enzimas y a otras de la membrana Ectoenzimas.

La sustancia es el sustrato de las vías metabólicas propias de cada microorganismo. Estas enzimas se pueden denominar como Endoenzimas.

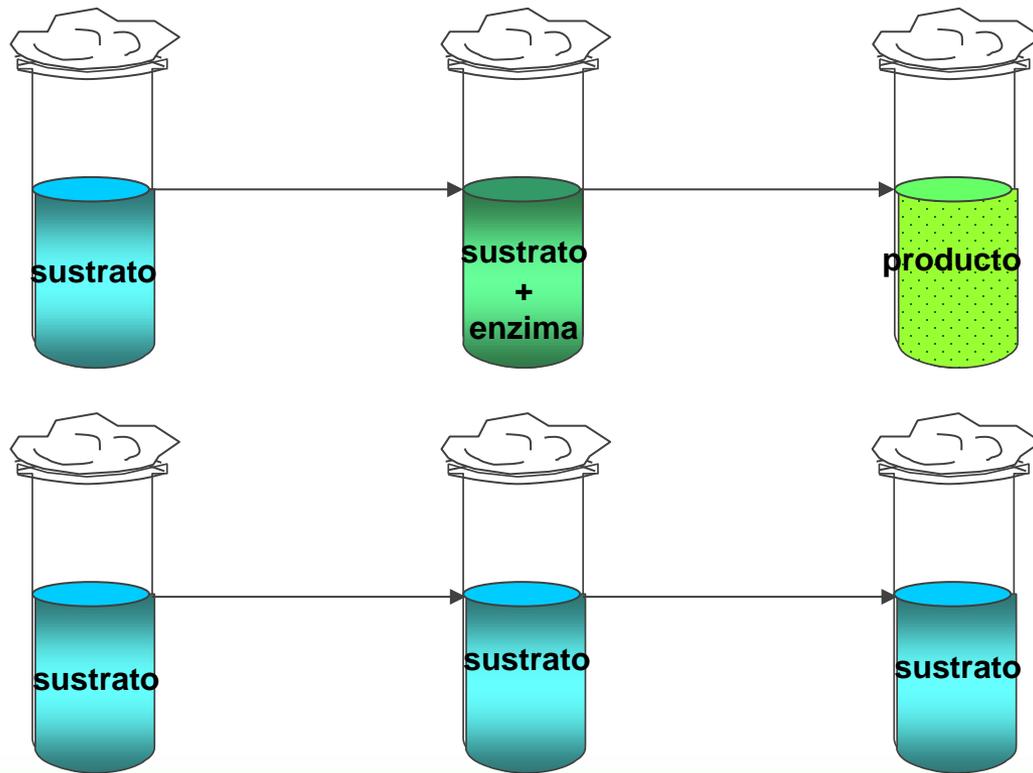


Hay enzimas que se excretan al exterior para degradar los sustratos y las moléculas más pequeñas sean transportadas a través de la membrana para que continúen su proceso en una vía metabólica. Estas enzimas se conocen como exoenzimas.



Por la diversidad del metabolismo que pueden presentar los microorganismos, es posible caracterizarlos en función de las enzimas que pueden sintetizar.

Para esto se han desarrollado las pruebas bioquímica, que son determinaciones “in vitro” de la presencia o ausencia de enzimas. De acuerdo a las enzimas detectadas es posible establecer que especie de microorganismo tenemos.



la acción enzimática se pone de manifiesto con un indicador, que generalmente reacciona con el producto, siendo visible a simple vista

cuando el microorganismo no cuenta con la enzima, no hay cambio sobre el sustrato, por lo tanto no hay producto que interaccione con el indicador

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Agar:

- a) 0% líquido
- b) 0.4-0.8% semisólido
- c) 1.5 a 2.0% sólido

otras sustancias y compuestos:

- a) otra fuente de carbono
- b) fuente de nitrógeno
- c) factores de crecimiento
- d) sales minerales
- e) amortiguadores



sustrato:
sustancia principal sobre
la que actuará la enzima

Indicador o
revelador:

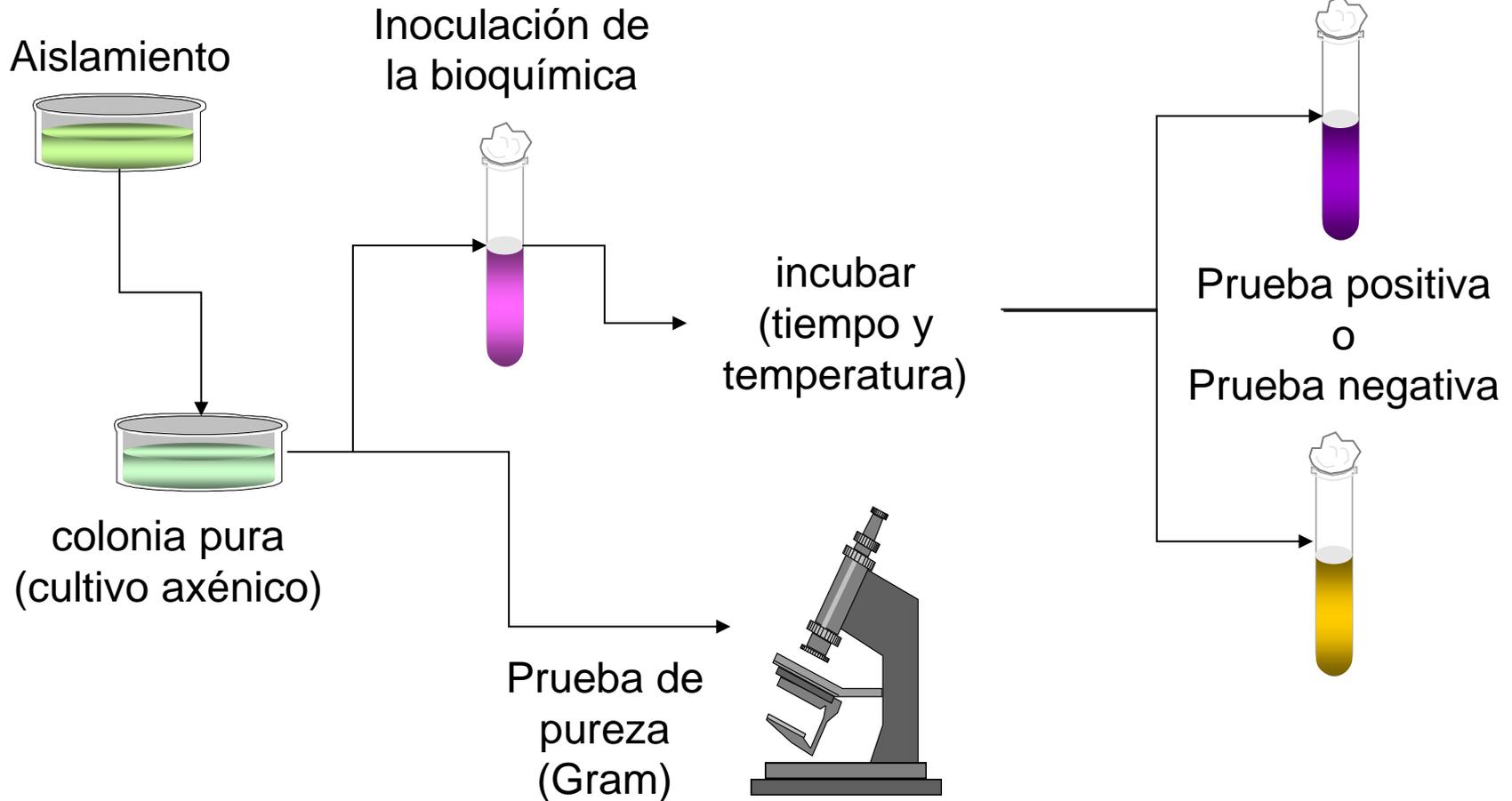
- a) ácido base
- b) colorimétrico
- c) características físicas

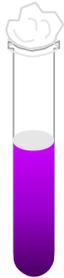
Cada una tiene indicaciones
para :

- a) inoculación
- b) tratamiento
- c) incubación
- d) lectura

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA HACER PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Lectura de la prueba





Falso positivo

Es un falso positivo cuando la prueba arroja un resultado +, debiendo ser negativo.

Causas probables: contaminación de microorganismos, inestabilidad del sustrato, errores con el reactivo revelador o indicador.

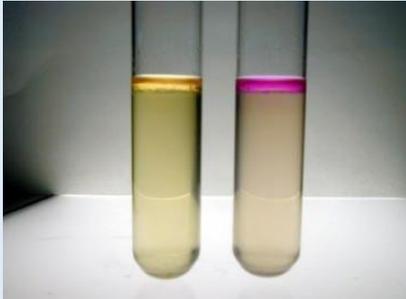


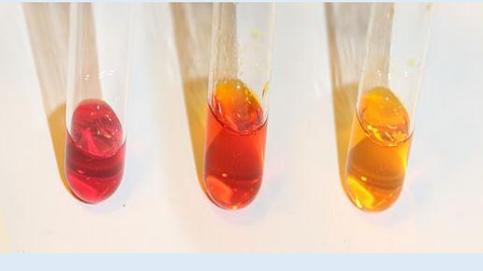
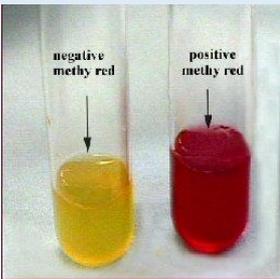
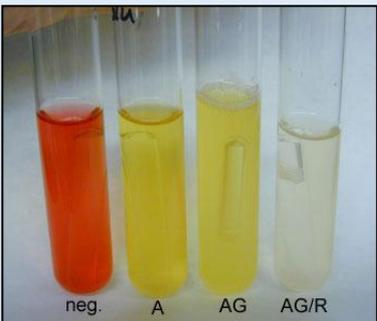
Falso negativo

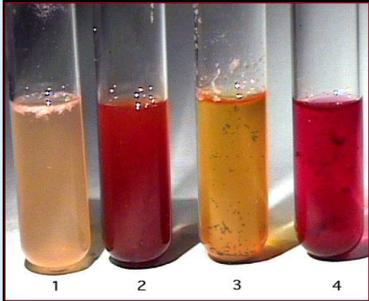
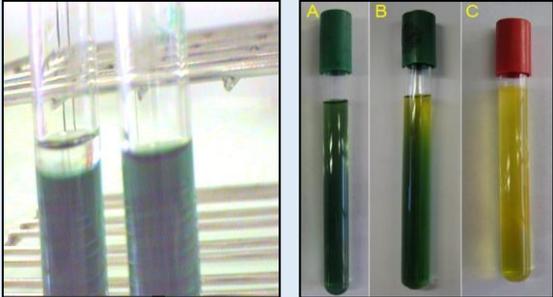
Es un falso negativo cuando la prueba indica un resultado -, cuando sería positivo.

Causas probables: sustrato incapaz de reaccionar, revelador caduco, microorganismo correcto pero tiempos excesivos, contaminaciones que alteren el resultado.

EJEMPLOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Prueba	Amilasa	Indol	Hidrólisis de lecitina
Medio	Agar Almidón	Caldo Triptona	Agar yema de huevo
Enzima	Amilasa	Triptofanasa	Lecitinasasa
Sustrato	Almidón	Triptofano	Lecitina
Indicador	Lugol (I_3^+)	Kovac's o Erlich	Lecitina
Positivo	Halo incoloro o rojizo	Anillo magenta	Precipitado
Negativo	Sin halo, color azul	Amarillo	Sin cambio en el medio
Imagen			

Prueba	Voges Proskauer	Rojo de Metilo	Uso de carbohidratos
Medio	Caldo RM/VP	Caldo RM/VP	C. Rojo de Fenol + lac
Enzima	Varias (ruta metaból.)	Varias (vía metaból.)	Varias (ruta metaból.)
Sustrato	Glucosa	Glucosa	Lactosa u otros azúcares
Indicador	α -naftol + KOH	Rojo de Metilo	Rojo de Fenol
Positivo	Color rojo	Color rojo	Vire amarillo
Negativo	Amarillo o sin cambio	Amarillo o sin cambio	Sin cambio o rosa
Imagen			

Prueba	Reducción de nitratos	Oxidación fermentación
Medio	Caldo nitrato	O/F (Hugh y Leifson)
Enzima	Varias (ruta metaból.)	Varias (ruta metaból.)
Sustrato	Nitrato de sodio	Glucosa u otro azúcar
Indicador	Reactivos A y B de Griess	Azul de bromotimol
Positivo	Rojo sin Zn, Amarillo con Zn	Vire amarillo
Negativo	Amarillo sin Zn, Rojo con Zn	Sin cambio
Imagen		

IDENTIFICACIÓN POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Especie	Crec. AS (22°C)	Crec. AN (37°C)	Glu	Mal	Ácidos a partir de azúcares			Red. NO ₃ ⁻	Polisac. Sac
					Lactosa	Sacarosa	Fructosa		
<i>N. gonorrhoeae</i>	0	0	+	0	0	0	0	0	0
<i>N. meningitidis</i>	0	V	+	+	0	0	0	0	0
<i>N. lactamica</i>	V	+	+	+	+	0	0	0	0
<i>N. cinerea</i>	0	+	0	0	0	0	0	0	0
<i>N. polysaccharea</i>	+	+	+	+	0	0	0	0	0
<i>N. subflava</i>	+	+	+	+	0	V	V	0	V
<i>N. sicca</i>	+	+	+	+	0	+	+	0	+
<i>N. mucosa</i>	+	+	+	+	0	+	+	+	+
<i>N. flavescens</i>	+	+	0	0	0	0	0	0	+
<i>N. elonga</i>	+	+	0	0	0	0	0	0	0

IDENTIFICACIÓN POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>E. coli</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia rubidaea</i>	<i>Providencia rustigianii</i>	<i>Citrobacter braakii</i>
Producción de indol	+	+	-	+	-	-	-	+	v
H ₂ S (TSI)	+	-	-	-	+	-	-	-	v
Citrato de Simmons	-	-	v	-	v	v	v	-	+
Lisina descarboxilasa	+	v	+	-	-	+	v	-	-
Arginina dehidrolasa	-	v	-	-	-	-	-	-	v
Ornitina descarboxilasa	+	v	+	+	+	-	-	-	+
Hidrólisis de Urea	-	-	-	+	+	v	v	-	v
Utilización Malonato	-	-	v	-	-	v	v	-	-
Gas de Glucosa	+	+	+	v	+	+	v	v	+
Fermentación de:									
Lactosa	-	v	v	-	-	v	+	-	+
Sorbitol	-	v	-	-	-	v	-	-	+
Arabinosa	v	+	+	-	-	v	+	-	+
Sacarosa	-	v	v	-	v	v	+	v	-
Manitol	-	+	+	-	-	+	+	-	+
Dulcitol	-	v	-	-	-	v	-	-	v
Adonitol	-	-	-	-	-	v	v	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	+	v	-	-
Rafinosa	-	v	-	-	-	+	+	-	-
Motilidad (36°C)	+	v	+	v	+	-	v	v	+

(+) positivo; (-) negativo; (v) variable

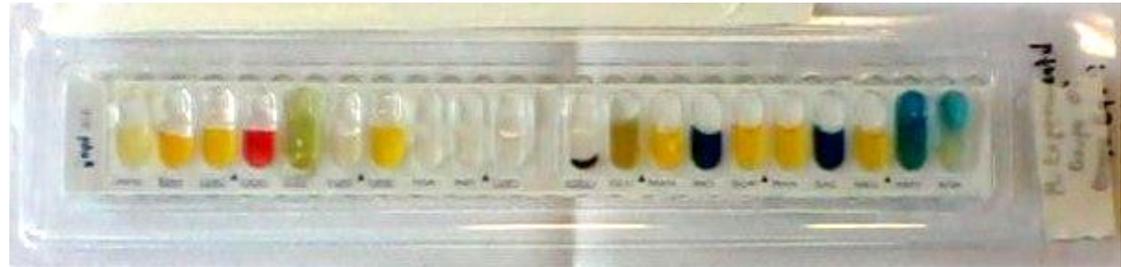
Microorganismo Problema: Forma bacilar corta, Gram (-). Bioquímicas: Indol positivo; H₂S negativo; Citrato de Simmons negativo; Arginina dehidrolasa negativo; Ornitina descarboxilasa positivo; Hidrólisis de Urea positivo; Malonato negativo; Glucosa Ácido y gas; Lactosa negativo; Manitol negativo; Adonitol negativo; Rafinosa negativo; Movilidad positiva.

Sistemas miniaturizados API (Bio-Mérieux)

Índice Analítico de Perfil (Analytical Profile Index, API)

Ejemplo Sistema 20E 20 por veinte determinaciones y E de enterobacterias

Hay más tipos de tiras API



Sistemas Vitek (Bio-Mérieux)

Sistema automatizado

Usa tarjetas de identificación

Hay varios tipos de tarjetas



BIOART™
Advanced Reporting Tool
for VITEK® 2 Systems

