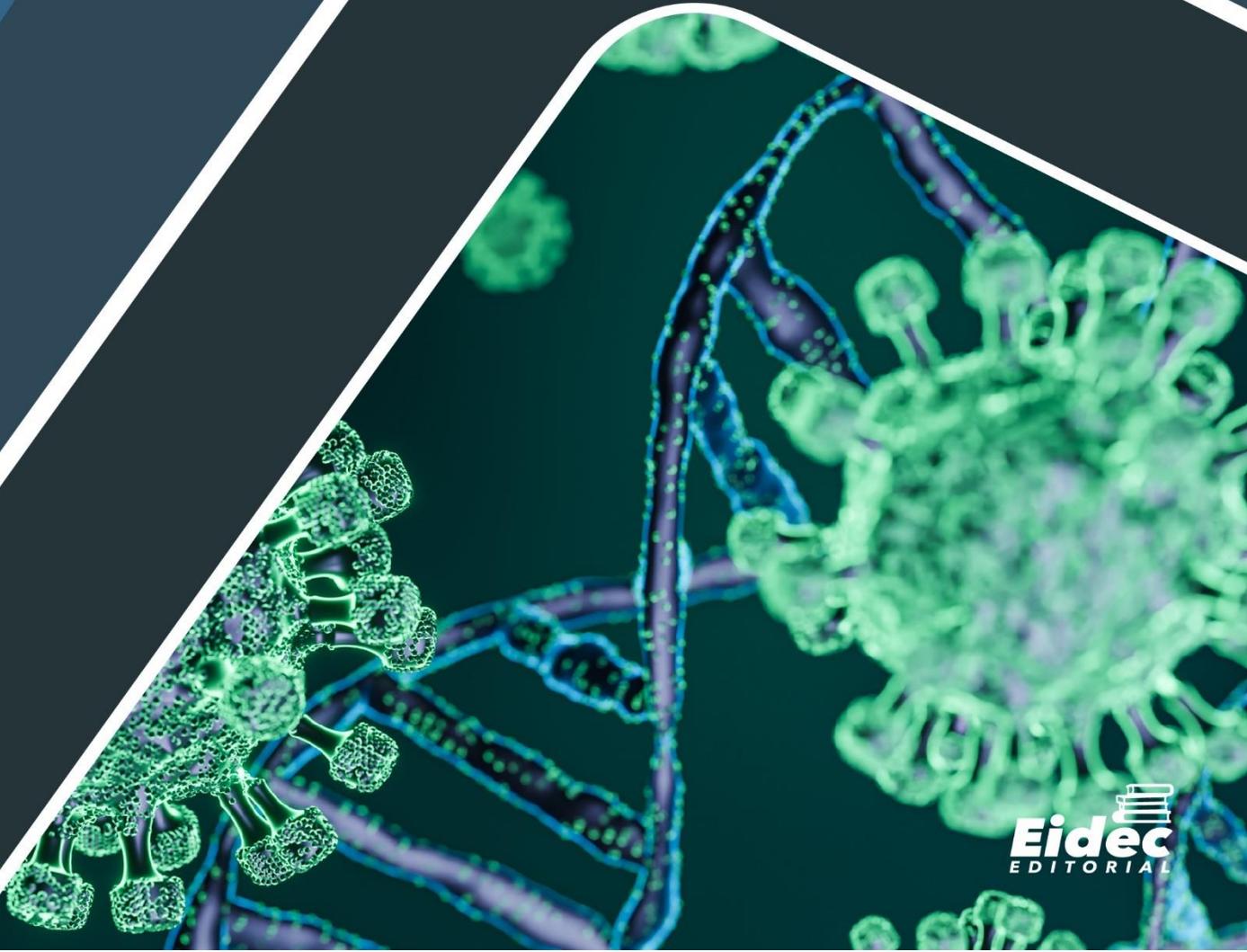
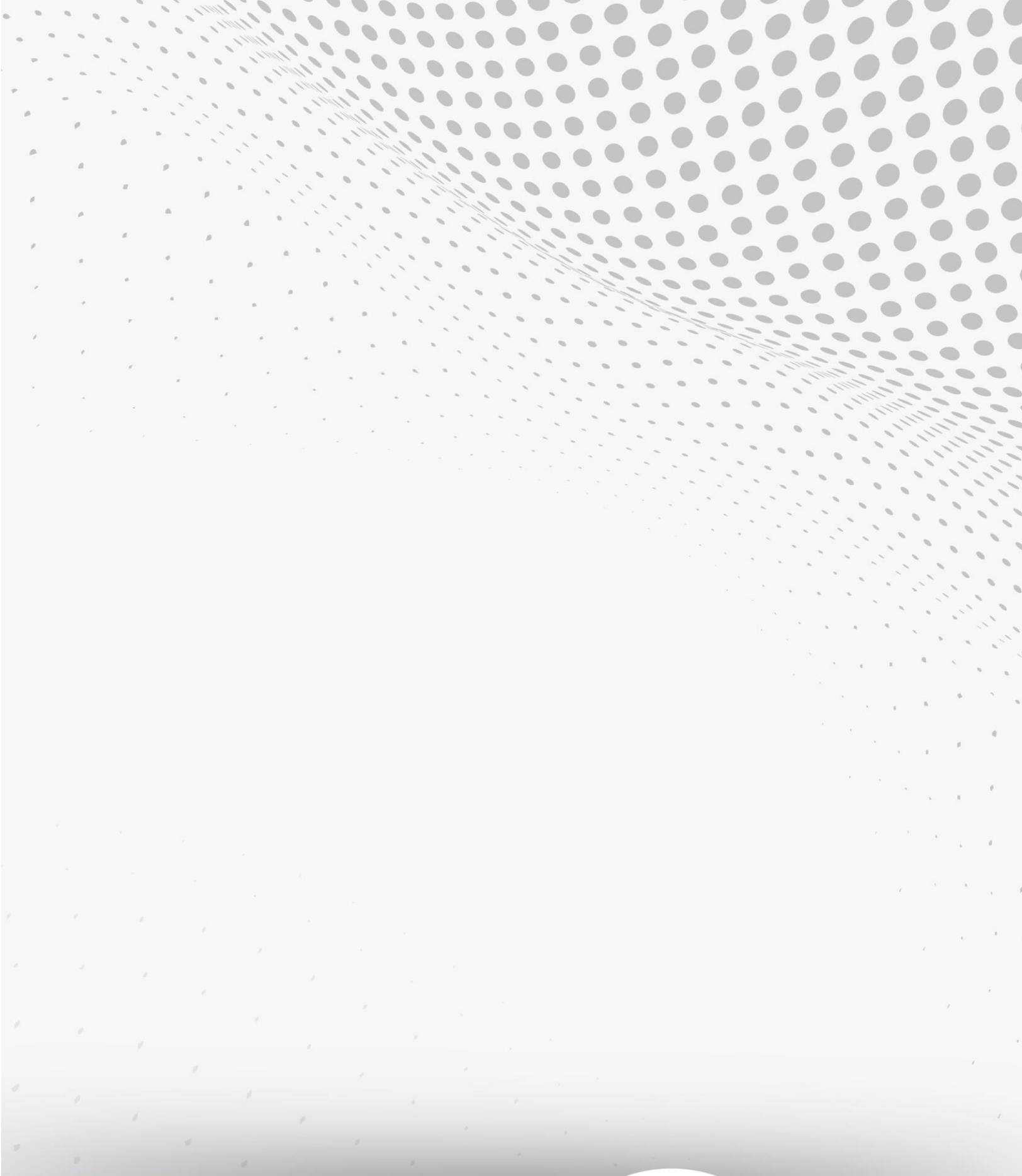


Conceptos Básicos en

FISIOLOGÍA MICROBIANA





CONCEPTOS BÁSICOS EN FISIOLOGÍA MICROBIANA

COLECCIÓN RESULTADO DE INVESTIGACIÓN

Primera Edición 2024 Vol. 1

Editorial EIDEC

Sello Editorial EIDEC (978-958-53018)

NIT 900583173-1

ISBN: 978-628-96378-8-5

Formato: Digital PDF (Portable Document Format)

DOI: [Doi.org/10.34893/o1397-7005-1166-n](https://doi.org/10.34893/o1397-7005-1166-n)

Publicación: Colombia

Fecha Publicación: 30/10/2024

Coordinación Editorial

Escuela Internacional de Negocios y Desarrollo Empresarial de Colombia – EIDEC

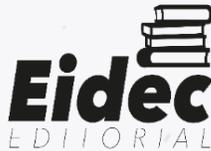
Centro de Investigación Científica, Empresarial y Tecnológica de Colombia – CEINCET

Red de Investigación en Educación, Empresa y Sociedad – REDIEES

Revisión y pares evaluadores

Centro de Investigación Científica, Empresarial y Tecnológica de Colombia – CEINCET

Red de Investigación en Educación, Empresa y Sociedad – REDIEES



Coordinadores editoriales

Paula Alejandra Noguera Zambrano
Editorial EIDEC

Dr. Cesar Augusto Silva Giraldo

Centro de Investigación Científica, Empresarial y Tecnológica de Colombia – CEINCET – Colombia.

Dr. David Andrés Suarez Suarez

Red de Investigación en Educación, Empresa y Sociedad – REDIEES – Colombia.

El libro **CONCEPTOS BÁSICOS EN FISIOLÓGÍA MICROBIANA**, está publicado bajo la licencia de Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) Internacional (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.es>). Esta licencia permite copiar, adaptar, redistribuir y reproducir el material en cualquier medio o formato, con fines no comerciales, dando crédito al autor y fuente original, proporcionando un enlace de la licencia de Creative Commons e indicando si se han realizado cambios.

Licencia: CC BY-NC 4.0.

NOTA EDITORIAL: Las opiniones y los contenidos publicados en el libro **CONCEPTOS BÁSICOS EN FISIOLÓGÍA MICROBIANA**, son de responsabilidad exclusiva de los autores; así mismo, éstos se responsabilizarán de obtener el permiso correspondiente para incluir material publicado por parte de la **Editorial EIDEC**.



CONCEPTOS BÁSICOS EN FISIOLÓGÍA MICROBIANA

BASIC CONCEPTS IN MICROBIAL PHYSIOLOGY

AUTORES

Juan Carlos Prada Herrera¹
Yumar Esther Ruidiaz Méndez²
Carla Cecilia Bolaños Contreras³
Margarita Rosa Vizcaino Bermejo⁴
Ximena Paola Rodríguez⁵
Kelín Roxana Esquea⁶
Sandra Rodríguez Puerta⁷
Abid Silvestre Cañate⁸
Patricia Herrera Demares⁹
Loris Carrillo Oliveros¹⁰

Pares evaluadores: Red de Investigación en Educación, Empresa y Sociedad – REDIEES.¹¹

¹ juanprada@unicesar.edu.co

² yumarruidiaz@unicesar.edu.co

³ carlabolanos@unicesar.edu.co

⁴ margaritavizcaino@unicesar.edu.co

⁵ ximenarodriguez@unicesar.edu.co

⁶ kelinesquea@unicesar.edu.co

⁷ sandrarodriguez@unicesar.edu.co

⁸ abidcanate@unicesar.edu.co

⁹ patriciaherrera@unicesar.edu.co

¹⁰ loriscarrillo@unicesar.edu.co

¹¹ Red de Investigación en Educación, Empresa y Sociedad – REDIEES. www.rediees.org

CONTENIDO

PRÓLOGO.....	12
2. FUNDAMENTOS CONCEPTUALES	14
UNIDAD 1: DESARROLLO EVOLUTIVO DEL MUNDO MICROBIANO	17
3. Evolución del mundo microbiano	17
3.1. Fundamentos principales de fisiología microbiana	
3.2. Análisis de la fisiología microbiana	
UNIDAD 2. FUNDAMENTOS METABOLICOS DE LOS MICROORGANISMOS	24
4. Principios de nutrición y química celular	24
4.1. Clasificación nutricional	25
4.1.1. Fundamentos y mecanismos de la nutrición autótrofa	
4.1.1.1. Modo de acción de fotosintetizadores autótrofos	
4.1.1.2. Modo de acción de quimiosintéticos autótrofos	
4.1.2. Fundamentos y mecanismos de la Nutrición heterótrofa.	
4.1.2.1. Fotoheterótrofos	
4.1.2.2. Quimioheterótrofos	
4.2. Nutrición bacteriana	26
4.2.1. Requerimientos nutricionales necesarios para la célula bacteriana	
4.2.1.1. Macronutrientes y micronutrientes	
4.2.1.1.1. Macronutrientes	
4.2.1.1.2. Micronutrientes	
4.3. Donadores y aceptores de electrones.....	29
4.4. Clasificación microbiana según sus fuentes de carbono y energía	30
4.5. Torre de electrones	30
4.6. Compuestos de alto rendimiento energético	31
4.7. Fuerza protón motriz	32

4.8. Respiración	33
4.8.1. Mecanismos de respiración celular	
4.8.1.1. Respiración aerobia	
4.8.1.2. Respiración anaerobia	
4.9. Proceso de la Glucólisis	34
4.9.1. Vías metabólicas alternas para generar energía	
4.9.1.1. Vía metabólica de Entner-Doudoroff	
4.9.1.2. Vía de las pentosas fosfato o vía de las pentosas Deshunt	
4.10. Proceso metabólico del ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo de Krebs	37
4.10.1. Fases y procesos claves del ciclo de Krebs	
4.10.2. Sitio de acción de los ácidos tricarbónicos	
4.10.3. Descripción general de las etapas metabólicas de los ácidos tricarbónicos	
4.10.4. Funcionalidad de los ácidos tricarbónicos	
4.11. Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa	40
4.11.1. Cadena transportadora de electrones	
4.11.1.1. Complejos de la cadena de transporte	
4.11.1.1.1. NADH deshidrogenasa o complejo I	
4.11.1.1.2. Succinato deshidrogenasa o complejo II	
4.11.1.1.3. Ubiquinona-citocromo c oxido-reductasa o complejo III	
4.11.1.1.4. Citocromo oxidasa o complejo IV	
UNIDAD 3: DINÁMICAS DE PROLIFERACIÓN MICROBIANA	44
5. Proliferación microbiana	44
5.1. Factores determinantes en la proliferación microbiana	46
5.1.1. Elementos requeridos por los microorganismos para su desarrollo	
5.1.2. Sustratos para el crecimiento	
5.1.3. Influencia del agua en el crecimiento	
5.1.4. Influencia de la temperatura	
5.1.5. Influencia del oxígeno y la luz	
5.1.6. Influencia del pH	
5.2. Etapas y regulación de la división celular	49
5.2.1. Proceso mitótico o cariocinético (división nuclear)	
5.2.2. Proceso citocinético (Organización y distribución del citoplasma y orgánulos celulares)	
5.3. Etapas de división bacteriana a nivel celular	52

5.4. Función de las proteínas FTS y MRB en la división celular	53
5.5. Proceso biosintético del peptidoglicano	56
5.6. Métodos cuantitativos para determinar el crecimiento microbiano	57
5.7. Métodos para medir el incremento de poblaciones microbianas en números de célula	57
5.7.1. Cuantificación celular de masa bacteriana	
5.7.1.1. Enfoques directos	
5.7.1.2. Enfoques indirectos	
5.7.2. Cuantificación numérica de individuos	
5.7.2.1. Técnicas directas	
5.7.2.2. Técnicas indirectas	
5.8. Ecuaciones matemáticas y modelos aplicados en el crecimiento microbiano	63
UNIDAD 4. DIVERSIDAD DE PROCESOS METABÓLICOS	66
6. Diversidad en los procesos metabólicos a nivel microbiano	66
6.1. Principios de fotografía	67
6.1.1 Procesos fotosintéticos en función de las clorofilas	
6.1.1.1. Captación de luz mediante pigmentos fotosintéticos	
6.1.1.1.1. Relación estructural de membranas fotosintéticas, cloroplastos y cromosomas	
6.1.1.1.2. Funcionalidad de los Carotenoides	
6.1.1.1.3. Rol de las Ficobiliproteínas y ficobilisoma como captadores de luz	
6.1.1.2. Proceso fotosintético anoxigénico	
6.1.1.3. Proceso fotosintético oxigénico	
6.2. Mecanismos para fijación dióxido de carbono	76
6.2.1. Mecanismos del ciclo de Calvin en la fotosíntesis	
6.2.2. Bacterias verdes y su mecanismo de autotrofia	
6.3. Quimiolitotrofia	79
6.3.1. Proceso oxidativo de hidrógeno (H ₂)	
6.3.1.1. Energía derivada del proceso oxidativo del hidrógeno	
6.3.2. Dinámica de la oxidación de compuestos del azufre reducidos	
6.3.2.1. Energía derivada del proceso oxidativo del azufre.	
6.3.3. Proceso oxidativo del hierro (Fe ²⁺)	
6.3.3.1. Bacterias con capacidad de oxidar hierro.	

6.4. Modelos de fermentación	84
6.4.1. Aspectos energéticos y equilibrio redox	
6.4.1.1. Fosforilación a nivel de sustrato y compuestos ricos en energía.	
6.4.2. Clasificación de las fermentaciones	
6.4.2.1. fermentación del ácido láctico	
6.4.2.2. Fermentaciones ácido mixtas	
6.4.2.3. Fermentación de aminoácidos	
6.4.2.4. Fermentación alcohólica	
6.5. Aceptores de electrones distintos al oxígeno	90
6.5.1. conceptos de la respiración anaeróbica	
6.5.2. Aceptores alternativos de electrones y escala de redox.	
6.5.3. Reducciones asimiladoras y desasimiladoras.	
6.5.3.1. Fase reductora de nitrato y desnitrificación.	
6.5.3.1.1. Bioquímica de la reducción desasimilatoria de nitrato	
6.5.3.2. Mecanismos Bioquímicos y energéticos de sulfato reducción.	
UNIDAD 5. INTERACCIONES MICRONIANAS EN SU ENTORNO	99
7. Hábitat microbiano	99
7.1. Microbioma- microbiota	99
7.1.1. Microbios albergados en el cuerpo	
7.1.1.1. Piel y manos	
7.1.1.2. Microbiota de la bucal	
7.1.1.3. Microbiota de la faríngea	
7.1.1.4. Microbiota de las mucosas	
7.1.1.5. Microbiota pulmonar normal	
7.1.1.6. Microbiota normal de la uretra anterior	
7.1.1.7. Microbiota vaginal normal	
7.1.1.8. Microbiota normal del estómago	
7.1.1.9. Microbiota intestinal delgada	
7.1.1.10. Microbiota intestinal gruesa	
7.1.1.11. Microbiota bucal	
7.2. Interacciones a nivel microbiano	112
7.3. El agua como transmisor de variedad de enfermedades	113
7.3.1. Enfermedades transmitidas a través del agua	

7.4. Alimentos como transmisores de enfermedades	115
7.4.1. Causas De las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS)	
7.4.2. Enfermedades alimentarias más comunes	
7.5. Factores intrínsecos y extrínsecos	117
7.5.1. Factores intrínsecos:	
7.5.2. Factores extrínsecos:	
7.6. Aislamiento microbiano en entornos naturales	119
7.7. Cultivos axénicos	120
7.7.1. Proliferación de cultivos axénicos	
7.8. Medios de cultivos químicamente definidos y no definidos	122
7.9. Medios de cultivo diversos	123
8. BIBLIOGRAFÍA	124
 ANEXOS	 132

PRÓLOGO

Los microorganismos, también conocidos como microbios son organismos vivos de tamaño diminuto (microscópicos), que contienen un metabolismo capaz de proporcionar mecanismos adecuados para su crecimiento y reproducción. Son organismos vivos con dotaciones individuales que, a diferencia de otros seres vivos como lo son las plantas y los animales superiores, tienen una organización biológica básica, elemental. Estos organismos incluyen bacterias las cuales son organismos procariotas unicelulares y protozoos identificados como eucariotas, también incluye una parte de la familia de los hongos y algas, e incluso los microorganismos considerados como ultramicroscópicos, denominados virus.

La fisiología microbiana, es una de las disciplinas de la microbiología, centrada en la investigación de propiedades físicas y químicas del mundo microbiano, como son las bacterias que habitan en la biosfera, este estudio abarca su diversidad y actividad metabólica, su ecología y procesos evolutivos, comprendiendo de tal forma, las funcionalidades llevadas a cabo por los microorganismos en el ecosistema. La detección de gran número de microfósiles bacterianos en rocas sedimentadas con casi 4.000 millones de años de antigüedad refleja el trabajo de sus descendencias en la configuración de la atmósfera terrestre y evolución de la biodiversidad de organismos conocidos e identificados actualmente. Por lo tanto, estos seres vivos han colonizado y colaborado en la elaboración de definiciones precisas sobre los ecosistemas presentes en la tierra, que implican su desarrollo, adaptabilidad y comprende una amplia diversidad de procesos metabólicos. Estos microorganismos, participan activamente en los ciclos biogeoquímicos al convertir compuestos inorgánicos en orgánicos, así como descomponer, clasificar y reciclar tantos los residuos generados de forma natural como aquellos que son producidos por las actividades humanas.

A lo largo del tiempo, la sociedad ha coexistido con los distintos modelos de acción de estos organismos; de tal forma, se han abordado interacciones benéficas con base en la utilización de sus actividades metabólicas que permiten el perfeccionamiento y producción de productos destinados al avance y mejoramiento de la calidad de vida humana, a través de lo que se

conoce como procesos biotecnológicos. Desde mucho antes del registro escrito, se ha aprovechado esta capacidad para perfeccionar la producción de alimentos que incluye derivados lácteos, embutidos, vinos, cervezas u otros productos que requieran procesos fermentativos. Mediante la comprensión del metabolismo de procariotas, ha sido importante en la elaboración y selección de antibióticos, los cuales han permitido abordar con resultados demasiado optimistas la gran masa de plagas y enfermedades producidas por bacterias que nos han acosado desde tiempos inmemoriales. Al comprender la fisiología de estos organismos se han podido crear y desarrollar técnicas de genética y operaciones de clonación molecular llamadas métodos de ADN recombinante, que son consideradas como el origen de una nueva era de la biotecnología con innumerables beneficios implementados y experimentados en gran medida en diversas industrias (Valenzuela, 2009).

Para entender los diversos comportamientos a nivel microbiano, en áreas naturales y en sitios de trabajo como laboratorios, es necesario tener un conocimiento profundo de sus funciones celulares tomando como ejemplo principalmente hongos y bacterias, se describen y analizan las etapas de vida de estos organismos a través de sus funciones celulares, enfocado en características bioquímicas y citológicas.

Este manual adopta un enfoque integral, buscando explicar el crecimiento, diferenciación, y el comportamiento de todos los microorganismos de forma general y en conjunto.

El objetivo principal de este manual es comprender las propiedades básicas de los microorganismos de forma integral. Aprender cómo la combinación de hallazgos investigativos a nivel bioquímicos y microscópicos nos permite comprender mejor la función de estos organismos, incluida su proliferación, comportamiento, adaptabilidad y reproducción. Además, guía a los estudiantes de microbiología en la realización de análisis crítico del aporte de la biología molecular a la fisiología microbiana, sus grandes logros y fracasos, les brinda a los estudiantes una herramienta que les proporcione los conocimientos, habilidades y métodos para comprender el aislamiento y estudio de los microorganismos que forman en su mayoría la definición de nuestra biosfera, y explorar su diversidad fisiológica y metabólica, desde el punto de vista ecológico hasta evolutivo. Esto nos permite evaluar el vasto potencial biotecnológico que nos ofrecen.

2. FUNDAMENTOS CONCEPTUALES

Ciclo de Calvin: También identificado como ciclo de fijación de carbono de la fotosíntesis o ciclo de Calvin-Benson. Fue descubierto en la universidad de California, Berkeley por Melvin Calvin, James Bassham y Andrew Benson, empleando la utilización de un isótopo radiactivo carbono-14. En la segunda etapa de la fotosíntesis, la energía se almacena, clasifica y queda atrapada en moléculas orgánicas como la glucosa. El proceso del ciclo de Calvin que se produce a través de reacciones que hacen parte de la llamada fase independiente de la luz, que se encarga de fijar el dióxido de carbono e incorporarlo a la materia orgánica individual en forma de glucosa con la intercepción de la enzima rubisco.

Ciclo de Krebs: También identificado como ciclo de los ácidos tricarbóxicos, Su nombre proviene quien la descubrió, el Alemán Hans Adolf Krebs, quién ganó un reconocimiento nobel en el año 1953 de Fisiología o Medicina junto con su compañero Fritz Lipmann. Este proceso llevado a cabo mediante la glucólisis tiene como producto neto dos ATP y dos piruvatos; en donde el piruvato en condiciones aeróbicas es transportado hasta la matriz de la mitocondria, pasando por un proceso de transformación progresiva en dióxido de carbono. Esta etapa, en donde el piruvato es descompuesto en dióxido de carbono se denomina ciclo de Krebs.

Coliformes fecales: Son una subpoblación de coliformes totales y tienen la capacidad de fermentar lactosa a 45°C, a diferencia de los coliformes totales quienes fermentan a una temperatura de 37°C. Forman un grupo con hábitat intestinal y capacidad de supervivencia, por lo que a este gran grupo en particular se le reconoce como indicador de contaminación fecal.

Coliformes totales: En términos generales, la denominación de coliformes hace referencia a un grupo de especies de bacterias en particular, quienes comparten características bioquímicas entre sí; además, se consideran importantes debido a su indicación de contaminantes en alimentos y aguas. El nombre de proviene de *coli*, haciendo referencia a *Escherichia coli*, la bacteria principal de este grupo.

Disponibilidad de oxígeno: Es un oxidante fuerte y el mejor aceptor de electrones en lo que respecta a respiración, por ello, puede ser mortal para las bacterias porque se producen formas tóxicas durante la reducción a agua. Hay aerobios estrictos, que necesitan oxígeno para sobrevivir; microaerófilos, que sólo pueden utilizar oxígeno cuando el contenido de oxígeno es inferior al nivel en el aire; anaerobios estrictos, que morirán si se exponen al oxígeno, y anaerobios tolerantes a los aeróbicos, quienes tienen la capacidad de tolerar el oxígeno y crecen en presencia de este, aunque no pueden utilizarlo, los microorganismos facultativos son aquellos que pueden sobrevivir en condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

Fermentación: Descrita como "la vie sans l'air" (vida sin aire) por su descubridor Louis Pasteur. Se denomina un proceso catabólico anaeróbico en el que los compuestos orgánicos actúan como donadores y aceptores de electrones, y se produce ATP mediante la fosforilación a nivel del sustrato.

Fosforilación a nivel de sustrato: La transferencia de manera directa de un grupo fosfato de alta energía que va desde un compuesto orgánico fosforilado a ADP, dando como producto la producción de ATP, mediante reducción se identifica como fosforilación a nivel de sustrato. En este proceso, las fermentaciones aprovechan la fosforilación basada en sustratos para generar ATP.

Fosforilación oxidativa: La investigación sobre la fosforilación oxidativa comenzó en 1906 con el informe de Arthur Harden en el cual se destaca el importante papel del fosfato en la fermentación celular, aunque en principio se tenía una idea que sólo estaban involucrados los fosfatos de azúcar. Sin embargo, a principios de la década de 1940, Herman Kalckar estableció claramente la relación entre la oxidación del azúcar y la producción de ATP, confirmando el papel central del ATP en la transferencia de energía. Posteriormente, en el año 1949, Friedkin y Morris Albert L. Lehninger indicaron que la coenzima NADH participa en las vías metabólicas. Este es un proceso que ocurre a nivel metabólico, utilizando la energía liberada por la oxidación de nutrientes para producir trifosfato de adenosina (ATP); recibe este nombre debido a su distinción y inferior rendimiento respecto a otras vías generadoras de ATP denominadas "nivel de sustrato".

Glucólisis: La vía de Embden-Meyerhof es el tipo de glucólisis más reconocido, que fue descrita originalmente en detalle por Gustav Embden y Otto Fritz Meyerhof. No obstante, no sólo está incluida esta ruta, sino también rutas alternativas, como la ruta Entner-Doudoroff; sin embargo, esta vía suele ser sinónimo de la vía de Embden-Meyerhofes (el comienzo del ciclo de Krebs). Es la vía inicial para el proceso de catabolismo (degradación) de los carbohidratos. La glucosa se descompone mediante el proceso de glucólisis, este proceso es llevado a cabo en el citoplasma; en el cual, por la descomposición de cada molécula de glucosa se generan dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH.

Metabolismo: En su totalidad, las reacciones químicas dentro de las células se llaman metabolismo celular, las cuales se denominan por ser una serie de reacciones químicas en las que el producto de una reacción es sustrato para la siguiente, recibiendo el nombre de metabolismo. Las rutas metabólicas a nivel general incluyen dos: rutas catabólicas y anabólicas. Las rutas anabólicas liberan energía al descomponer moléculas grandes en otras más pequeñas. Las rutas anabólicas usan la energía liberada por las rutas catabólicas para llevar a cabo la formación de moléculas más grandes a partir de moléculas más pequeñas. La relación entre estas dos rutas da como resultado un flujo continuo de energía a través del cuerpo.

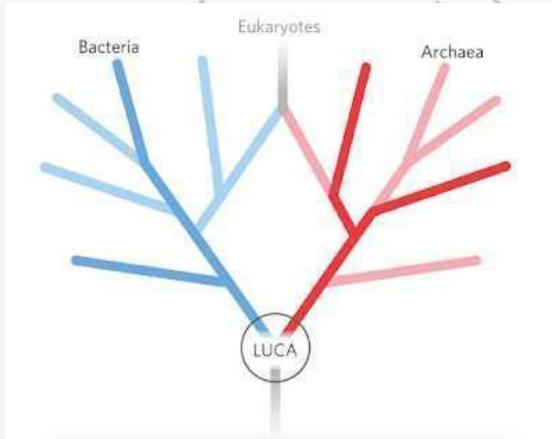
Método del número más probable (NMP): es un método con base a técnicas de estimación estadística que se enfoca en el hecho de que cuanto mayor es el número de bacterias en una muestra, mayor es la dilución necesaria para reducir la densidad hasta un punto que no permita que las bacterias crezcan en una serie de tubos de dilución. El número estimado de células se da mediante la agregación de células bacterianas a caldos con lactosa, identificando la presencia microbiana mediante la presencia o ausencia de fermentación formada en los tubos.

Respiración celular: Cabe señalar que los organismos vivos obtienen energía mediante este proceso. La respiración es responsable de capturar electrones de los compuestos de carbono, entre ellos se destaca la glucosa, y utilización de esta energía para producir ATP.

UNIDAD 1: DESARROLLO EVOLUTIVO DEL MUNDO MICROBIANO

3. Evolución del mundo microbiano

Figura 1
Evolución microbiana



Fuente: López, 2016

Según López (2016) quien aborda la evolución del mundo microbiano, señala que la comunidad científica aún no tiene certeza de cómo comenzó la vida a nivel terrenal con un

período aproximado de 3.800 millones de años. Presuntamente, todas las células provienen de un origen único nombrado LUCA (del inglés, Last Universal Common Ancestor) o progente, que representan ancestro en común de todas las formas de vida dadas a conocer. Según las investigaciones filogenéticas más recientes, se plantea que los eucariotas evolucionaron a partir de los procariotas; teniendo en cuenta esto, se establece que el ancestro en común entre bacterias y arqueas es LUCA; no obstante, no se cuenta con las pruebas directas acerca de la naturaleza de LUCA, ni de su lugar de origen inicial

Para comprender la naturaleza de este ancestro en común, una estrategia válida es identificar genes esenciales que comparten las bacterias y arqueas, suponiendo que estos genes hacen parte también del antepasado en común. Sin embargo, hoy en día se entiende que existe una transferencia horizontal entre un microorganismo y otro, que no se limita a la herencia vertical dada de los padres a sus descendencias. Por lo tanto, los investigadores han optado por la comparación genómica denominada como aproximación filogenética, en lugar de basarse en criterios universales. Por tanto, el propósito es encontrar aquellos genes adquiridos originalmente de los dominios bacteria y archaea, quienes posiblemente estuvieron presentes en LUCA. De este modo, los investigadores pueden estudiar la fisiología de LUCA mediante su identificación de genes, entendiendo

como este antepasado común obtenía los recursos de energía, carbono y nutrientes de la naturaleza para llevar a cabo su desarrollo.

Científicos de la universidad de Düsseldorf en Alemania, Instituto de Evolución Molecular, han examinado en un periodo de tiempo más de 6,1 millones de genomas de 134 arqueas y 1.847 bacterias, cifras que provienen de bases de datos acumuladas durante las últimas dos décadas. Estos millones de genes han sido categorizados en 286.514 familias de proteínas. Este análisis ha llevado a la identificación de 335 familias proteicas que constituyen aproximadamente el 0.1% en total de genes que probablemente provienen de LUCA. Estas familias proteicas abren una ventana hacia el hipotético genoma del ancestro en común y facilita la reconstrucción del entorno ecológico microbiano.

Según los hallazgos, LUCA no contaba con las enzimas típicas de un microorganismo que obtienen energía a través de compuestos orgánicos (quimioorganotrofos), pero tenía las características específicas de un microorganismo que obtiene energía a través de compuestos inorgánicos (quimiolitotrofos). Debido a la toxicidad brindada por el oxígeno, LUCA no lo podía emplear en su metabolismo, por ello era un anaerobio capaz de utilizar CO₂ y N₂ directamente del ambiente, además, dependía del hidrógeno y utilizaba el azufre (S). La presencia de la enzima girasa inversa del genoma de ADN, típica de los microorganismos adaptados a temperaturas elevadas (hipertermófilos), sugiere que LUCA habitaba en un entorno termófilo y prefería estas temperaturas. Además, estaba equipado con enzimas que incluían grupos FeS y FeNiS, indicando que probablemente los entornos abundantes de metales hacían parte de su hábitat. Desde una perspectiva metabólica, las bacterias del grupo *Clostridium* y las arqueas metanógenas son las formas de vida que en la actualidad más se asemejan a LUCA. Con base en estos datos, es probable que LUCA haya habitado en un ambiente hidrotermal marino caracterizado por la presencia de abundante hierro, hidrógenos y CO₂, siendo este un entorno altamente activo desde el punto de vista geoquímico. Tras la aparición de LUCA, desde tiempos inmemorables, los microorganismos experimentaron una serie de cambios a nivel genómico que les permitió avanzar, evolucionar y adaptarse a los entornos hostiles en el cual se frecuentaba.

Guerrero y Berlanga (2009) resaltan que, en la evolución a lo largo del tiempo de los microorganismos, los cambios a nivel de genoma se centran en dos tipos de mecanismos denominados intracelulares e intercelulares.

Para el caso de mutaciones, deleciones, amplificaciones, entre otros, son considerados intracelulares; por otra parte, la transferencia horizontal es catalogada como la fuente primaria de cambio extrínseco (intercelular), en la que un microorganismo adquiere DNA de otro microorganismo. Las formas clásicas de transferencia horizontal incluyen la transducción, transformación, y la conjugación. En la transducción, la transferencia de DNA se da mediante un bacteriófago, de una célula a otra. La transformación se lleva a cabo cuando el DNA libre ingresa en una célula receptora. La conjugación bacteriana requiere el contacto de una célula a otra y se realiza de acuerdo a la transferencia genética mediante plásmidos. En los procesos de transducción y transformación, la célula encargada de donar el DNA ha pasado por un proceso de lisis previamente. En el tercero, se necesitan células vivas, una donadora y una receptora. Estos mecanismos llevan a cabo de manera simple el transporte de un número elevado de bacterias o arqueas a otras, y de bacterias a plantas/animales, esquivando barreras de especie o niveles taxonómicos superiores, de tal forma, permiten que la información genética pase de un lado a otro entre organismos que filogenéticamente se encuentran muy alejados.

3.1. Fundamentos principales de fisiología microbiana

La capacidad de los microorganismos para prosperar en una amplia gama de entornos es un testimonio de las diversas características fisiológicas de cada microorganismo, que están determinadas por su microhábitat específico. El crecimiento de microorganismos es un proceso complejo que involucra interacciones entre la célula y su entorno, ya que la célula proporciona nutrientes al medio ambiente y, a su vez, está influenciada por las actividades metabólicas de las células. Esta intrincada relación sirve como base fundamental para el estudio de la fisiología. Comprender estas interconexiones es crucial para identificar y aprovechar el potencial de los grupos microbianos y de esta manera poder regularlos y controlarlos.

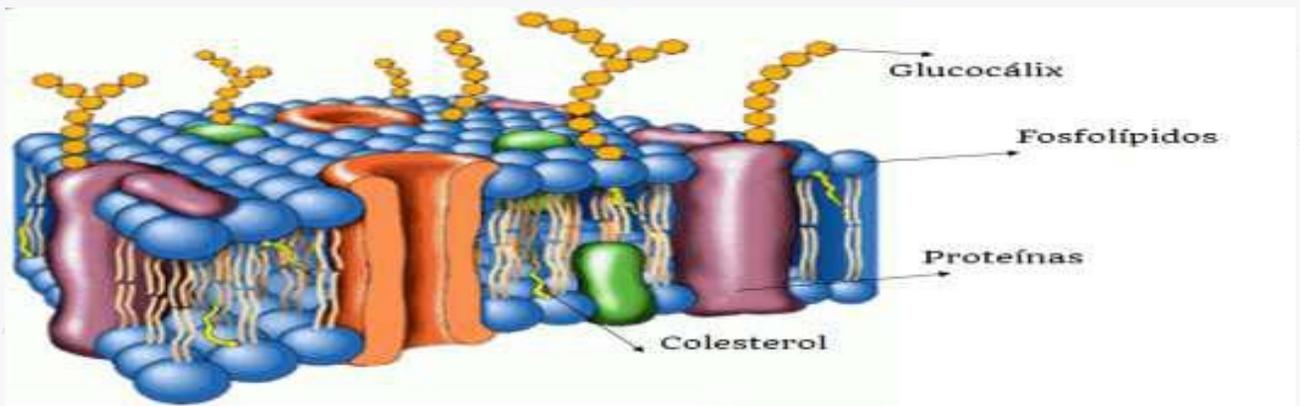
3.2 Análisis de la fisiología microbiana

El campo de la fisiología microbiana se centra en examinar y comprender los diversos cambios que ocurren dentro de los microorganismos. Se trata de definir los diferentes procesos que sufren los microorganismos, así como estudiar su regulación y los factores que influyen en estos eventos. Los microorganismos han evolucionado para prosperar en diversos entornos naturales, adaptándose para utilizar diversas fuentes de carbono, energía y poder de reducción. Las bacterias tienen la capacidad de metabolizar compuestos orgánicos debido a sus metabolismos; esto hace que se desarrollen variedad de microorganismos en diversos ambientes (Madigan y Col; 2015).

Membrana plasmática: la célula se encuentra delimitada por esta membrana quien separa su entorno y controla el intercambio de materiales dentro y fuera de la célula; aunque, su composición puede cambiar de acuerdo con el tipo de célula, se mantiene una funcionalidad constante

Figura 2

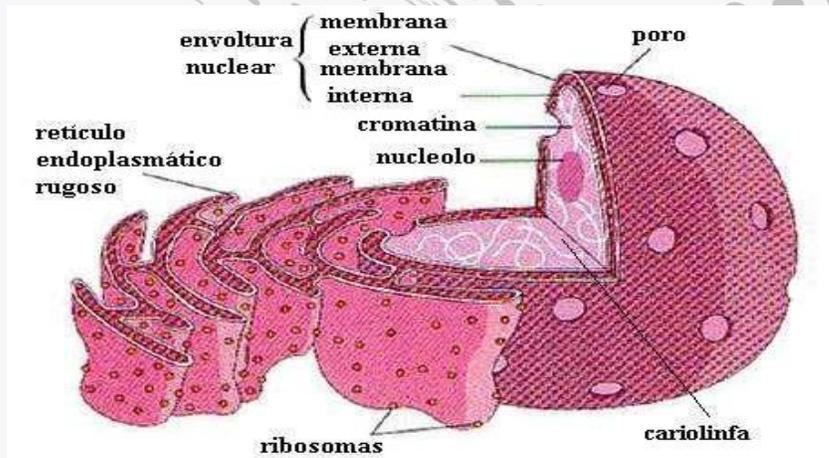
Membrana plasmática



Fuente: Oviedo, 2016.

Núcleo: Se encarga de guardar la información genética que se necesita para llevar a cabo la división de la célula, como se visualiza en la figura 3, puede darse en DNA Y RNA.

Figura 3.
Núcleo.

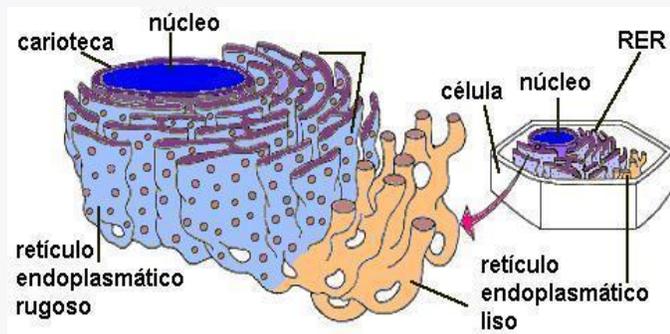


Fuente: Gonzales, 2013

Retículo endoplasmático (RE): Su trabajo es en base a la síntesis de biocompuestos que son requeridos para el funcionamiento correcto y normal a nivel celular

Figura 4

Diagrama tridimensional del RE.



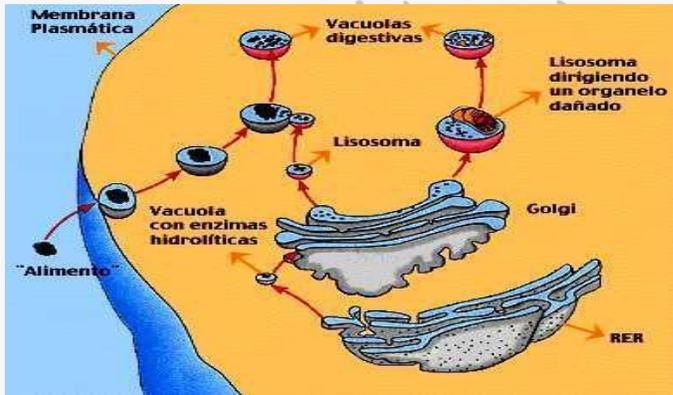
Fuente: Gonzales, 2002.

Aparato de Golgi: Se enfoca en el procesamiento, empaque y distribución proteica a distintas zonas de la célula

Lisosoma: Trabaja en la degradación de compuestos que se producen dentro y fuera de la célula.

Figura 5

Aparato de Golgi y lisosoma.

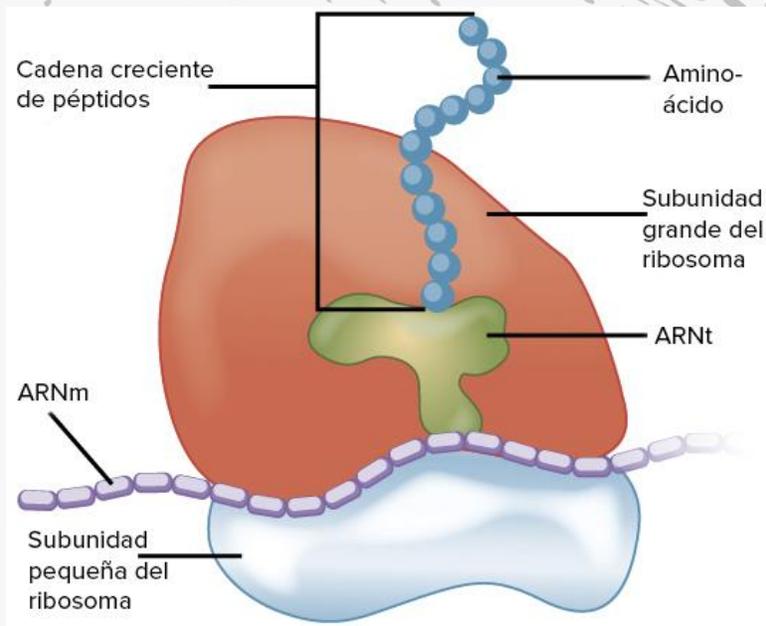


Fuente: Agundez, 2009.

Ribosomas: Se puede ubicar en el RE y su labor es la síntesis proteica

Figura 5.1

Ribosoma



Fuente: Rye, 2016

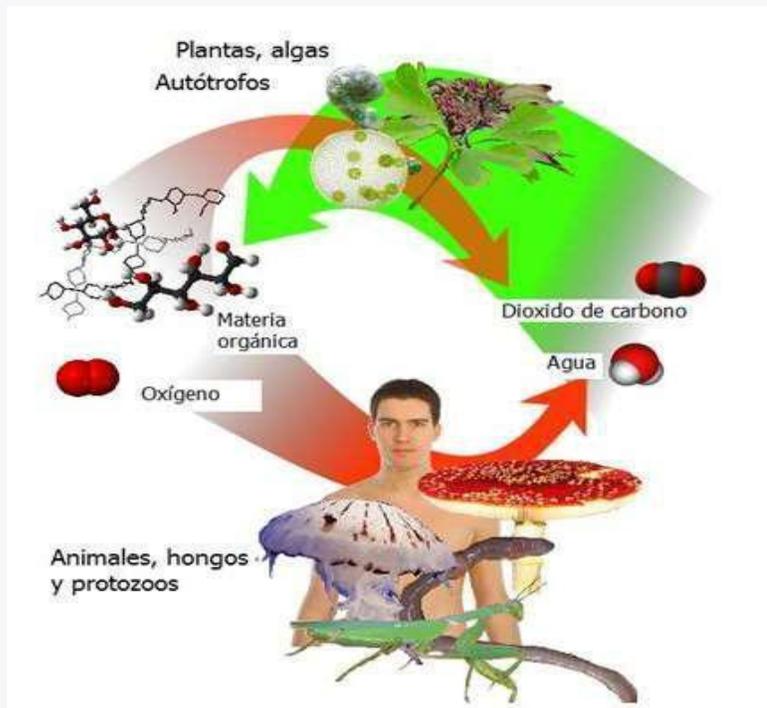
UNIDAD 2. FUNDAMENTOS METABOLICOS DE LOS MICROORGANISMOS

4. Principios de nutrición y química celular.

Cuenca (2016) destaca aspectos relevantes que se enfocan en la nutrición celular y la división de estos (nutrición autótrofa y heterótrofa), además menciona que aquellos procesos que requieren de energía y obtención de materia por parte de la célula para cumplir con sus funciones de vida y fabricar el material de la célula reciben la denominación de nutrición celular; a través de ella cada una de las células obtienen la energía que necesitan para desarrollarse y dividirse.

Figura 6

Nutrición de la célula



Fuente: Cabello, 2015.

Los procesos de nutrición se enfocan en 3 objetivos principales:

- ✓ Brindar energía.
- ✓ Brindar materiales de construcción para la síntesis y renovación de las estructuras orgánicas propias
- ✓ Brindar reguladores, sustancias que permitan que los procesos químicos sean regulados.

La nutrición de la célula requiere de los siguientes tipos de procesos:

1. Sustancia agregada del medio extracelular.
2. Uso químico de nutrientes a nivel metabólico
3. Evacuación de desechos al medio externo

4.1. Clasificación nutricional.

Debido a los nutrientes incorporados por la célula se conocen dos tipos de nutrición:

4.1.1. Fundamentos y mecanismos de la nutrición autótrofa

Se caracteriza por la agilidad que presentan los microorganismos para producir y sintetizar sustancias que son necesarias para realizar sus procesos metabólicos y nutritivo mediante sustancias inorgánicas.

4.1.1.1. Modo de acción de fotosintetizadores autótrofos

En el caso de algunos tipos de bacterias (bacterias verdes y púrpuras) y las plantas, la energía proviene de la luz del sol.

4.1.1.2. Modo de acción de quimiosintéticos autótrofos

La energía proviene de las reacciones oxidativas de tipo exotérmico como es el caso de bacterias nitrificantes, ferro bacterias, sulfo-bacterias.

4.1.2. Fundamentos y mecanismos de la Nutrición heterótrofa

Este tipo de nutrición figura a los organismos que adjuntan materia orgánica construida por otro organismo; dentro de los organismos heterótrofos se encuentran gran número de bacterias, animales, protozoos y hongos. Los microorganismos heterótrofos contienen dos formas esenciales en cuanto a la naturaleza energética:

4.1.2.1. Fotoheterótrofos

Son aquellos organismos que tienen como única fuente de energía la luz y mediante ella generan ATP y al mismo tiempo mediante otros organismos adquieren compuestos orgánicos como fuente carbónica; dentro de ellas se destaca *Rhodobacter* como bacteria no sulfurosa purpura

4.1.2.2. Quimioheterótrofos

La energía es adquirida mediante la ingesta de fuentes orgánicas de energía preformadas, las cuales llevan una síntesis por otros organismos, dentro de esta preformación están los lípidos, proteínas y carbohidratos. Dentro de este grupo se encuentran los *Lactobacillus*.

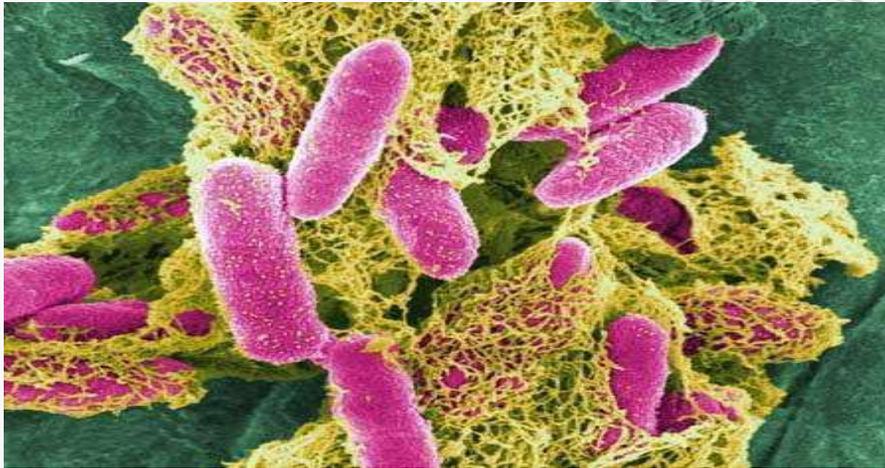
4.2. Nutrición bacteriana

Según lo mencionado por Montenegro (2015) esta nutrición realiza mediante la adquisición de sustancias químicas del ambiente en el que se encuentran por parte de las bacterias y de esta manera se ejerce el proceso de desarrollo de las mismas y se llevan a cabo dos fines:

- ✓ Finalidad catabólica energética
- ✓ Finalidad anabólica biosintética

Figura 7

Nutrición de las bacterias



Fuente: García, 2014.

4.2.1. Requerimientos nutricionales necesarios para la célula bacteriana

El mundo de las bacterias muestra una inmensa variedad de adaptabilidad metabólica cuando se trata de utilizar nutrientes. Esto incluye a los autótrofos, que obtienen su carbono de fuentes inorgánicas como el CO₂, así como a los heterótrofos que pueden utilizar una amplia gama de fuentes de carbono orgánico. En esencia, según los tipos de organismos, se requieren de nutrientes específicos que varían en cuanto al tipo y cantidad; de acuerdo a lo mencionado por Montenegro, (2015) algunos nutrientes conocidos como macronutrientes, son necesarios en cantidades significativas, mientras que otros se solicitan en cantidades mínimas, los cuales se denominan micronutrientes

Agua: El agua es importante para el crecimiento y desarrollo de las bacterias, ya que requieren cantidades importantes de ella. De hecho, muchas bacterias prosperan en ambientes con un nivel específico de humedad. Al considerar las funciones potenciales

del agua, no se puede pasar por alto su papel al proporcionar las condiciones necesarias para el crecimiento bacteriano, en este orden su papel es:

- El componente principal del protoplasto bacteriano.
- El entorno global en el que tienen lugar las reacciones biológicas.
- Una reacción bioquímica puede producir un excedente de reactivo, que luego se convierte en un producto.

Dentro de las fuentes de agua se encuentra:

- Endógeno se refiere a procesos que surgen de reacciones de oxidación-reducción.
- Exógeno se refiere a sustancias que se originan en el medio circundante y tienen la capacidad de atravesar las membranas.

4.2.1.1. Macronutrientes y micronutrientes

4.2.1.1.1. *Macronutrientes*

Carbono: Constituye el esqueleto de los carbohidratos, lípidos y proteínas, catalogados principalmente como los tres nutrientes más importantes, siendo fundamentales para los microorganismos y su dependencia del carbono. Estos compuestos son vitales tanto para la producción de energía como para los procesos estructurales de la célula

Nitrógeno: todos los agentes microbianos necesitan nitrógeno. El nitrógeno entra a formar parte de ácidos nucleicos, proteínas mediante una metabolización, haciendo parte también de polímeros de la pared celular. Los microorganismos pueden usar distintas fuentes de nitrógeno, entre ella se destaca N₂ atmosférico, nitratos, nitritos o sales de amonio, quienes utilizan compuestos inorgánicos, mientras que otros requieren de aminoácidos o péptidos catalogados como compuestos nitrogenados orgánicos

Hidrógeno y Oxígeno: Los dos son componentes importantes que hacen parte de un número considerable de compuestos orgánicos y están presentes en el agua (H₂O) como en diversos nutrientes; de la misma manera, en la atmósfera estos elementos presentan un rol importante, especialmente el oxígeno molecular (O₂) utilizado como aceptor final de electrones de la respiración aeróbica.

4.2.1.1.2. Micronutrientes

Fósforo: Es denominado un micronutriente que forman parte de polímeros a nivel de pared celular y fosfolípidos, además son necesario en el proceso de síntesis de ácidos nucleicos y ATP.

Potasio: Su funcionalidad es como las coenzimas y posiblemente desempeña un papel como catión en algunas estructuras aniónicas celulares y en estructuras de RNA

Azufre: Es un componente clave en coenzimas A, ferredoxina y biotina; además, es crucial para el proceso biosintético de cisteína, cistina, metionina, aminoácidos.

Magnesio: Es utilizado como un cofactor de reacciones bajo la acción del ATP, generado por enzimas.

4.3. Donares y aceptores de electrones

En todas las bacterias y células en general, se llevan a cabo procesos bioquímicos dentro de ellas que implican un constante intercambio de electrones, en este proceso de intercambio participan 2 sustancias diferentes, Por un lado se encuentran las donadoras de electrones y por otro los aceptores de los electrones ya mencionados, este intercambio se presenta recurrentemente en la respiración de la celular, de forma particular en la etapa transportadora de electrones alrededor de la cadena transportadora. En esta fase, el donante de electrones experimenta un proceso de oxidación y el aceptor de electrones se enfrenta a un proceso de reducción (Cardellá, 2007).

4.4. Clasificación microbiana según sus fuentes de carbono y energía

Según Montenegro (2015) los requerimientos de carbono de las bacterias permiten clasificarlas en dos grupos principales. Un grupo está formado por bacterias litotróficas o autótrofas, mientras que el otro grupo está formado por bacterias organotróficas o heterótrofas. La generación de energía en las bacterias está estrechamente relacionada con las relaciones entre las fuentes de energía, las fuentes de carbono y los donantes de electrones. Teniendo en cuenta lo anterior, las fuentes de carbono y energía obtenidas por las bacterias se clasifican en:

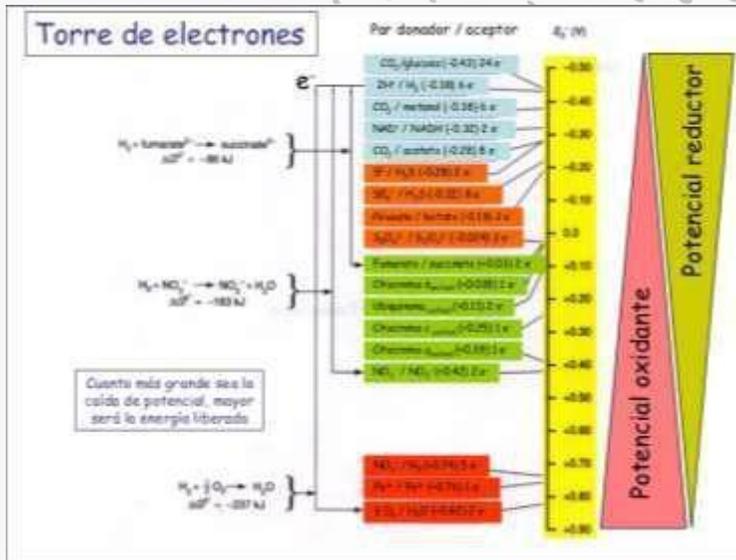
- a) Cuando se considera el suministro de energía, existen dos tipos de organismos: los **litotrofos**, que únicamente necesitan sustancias inorgánicas básicas, y los **organotrofos**, que dependen de compuestos orgánicos.
- b) En términos de biosíntesis:
- c)
 - Los autótrofos tienen la capacidad de crear sus propios compuestos utilizando elementos inorgánicos básicos.
 - Los heterótrofos, por otro lado, dependen de fuentes orgánicas para satisfacer sus necesidades de carbono.
 - Los autótrofos estrictos son bacterias que no pueden utilizar la materia orgánica como fuente de carbono para su crecimiento.
 - Los mixótrofos son bacterias que obtienen energía del metabolismo litotrófico pero dependen de sustancias orgánicas para su metabolismo biosintético.

4.5. Torre de electrones

Esta torre, representada en la figura 8 como una estructura vertical es una herramienta visual que facilita la comprensión de la transferencia de electrones que se realiza en los sistemas biológicos. Esta estructura organiza en escala los pares redox desde los más

negativos ubicados en la parte superior, hasta los más positivos situados en la parte inferior. Las sustancias reducidas en la parte de arriba tienden a donar electrones, en cambio, quienes aceptan los electrones son las sustancias que se oxidan, las cuales se encuentran ubicadas abajo (Rivas, 2015).

Figura 8
Torre de electrones



Fuente: Hoyos, 2012

4.6. Compuestos de alto rendimiento energético

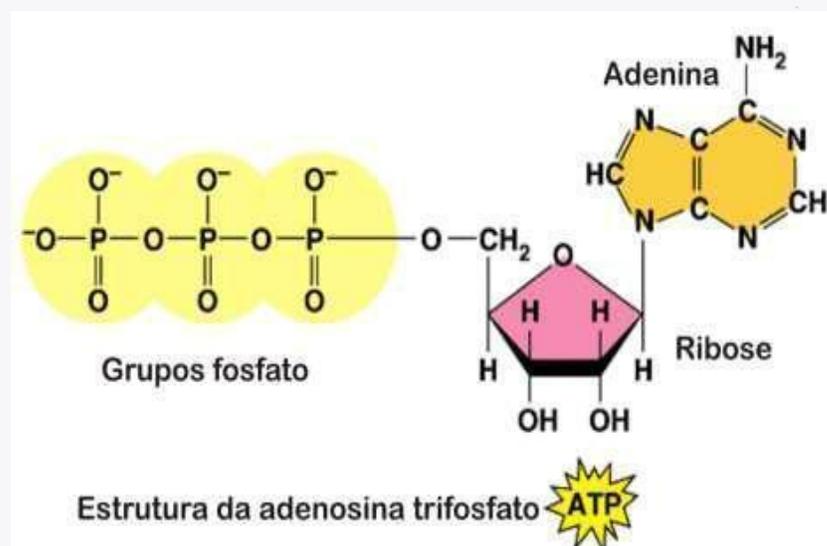
Según Serna (2009), los compuestos que se clasifican como de alta energía poseen uno o más enlaces químicos que liberan cantidades importantes de energía durante el catabolismo. Estos enlaces se denominan de alta energía porque retienen más energía en comparación con los enlaces estándar y se forman principalmente entre residuos de ácido fosfórico y diversos compuestos orgánicos. En estos fosfatos macroenergéticos el fósforo es siempre un componente.

El trifosfato de adenosina (ATP) es un compuesto energético crucial que suministra directamente energía para todas las reacciones celulares que la necesitan. Las células generan este compuesto utilizando nutrientes derivados tanto de plantas como de

animales. Durante el catabolismo, el ATP se descompone en ADP (difosfato de adenosina), liberando energía esencial para diversas funciones corporales críticas, incluida la digestión, la síntesis de compuestos químicos, la reparación de tejidos y la circulación.

A través del desdoblamiento de los nutrientes provenientes de los alimentos, se forma ATP mediante la reacción de ADP con una molécula de fósforo que se encuentre libre. Mediante los hidratos de carbono, grasas y proteínas se lleva a cabo la síntesis de ATP, ya que la energía que es absorbida por el ADP se libera mediado por una descomposición tal como se observa en la figura 9, enlazada con la molécula de fósforo que se encuentre libre.

Figura 9
Trifosfato de adenosina



Fuente: Moreno, 2015.

4.7. Fuerza protón motriz

En 1961, Peter Mitchell (citado por Berg et al., 2007) introdujo la hipótesis quimiosmótica, sugiriendo que la síntesis de ATP y el transporte de electrones se producen a través de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. El movimiento de electrones a través de la cadena respiratoria da como resultado el bombeo de protones desde el lado de la matriz hacia el lado citoplasmático de la membrana mitocondrial interna. Como consecuencia, los niveles de H⁺ disminuyen en

la matriz, generando un campo eléctrico negativo en ese lado. Para restablecer el equilibrio, los protones regresan y, según Mitchell, este flujo de protones facilita la síntesis de ATP. Esta distribución desigual y rica en energía de los protones se denomina fuerza motriz del protón.

4.8. Respiración

4.8.1. Mecanismos de respiración celular

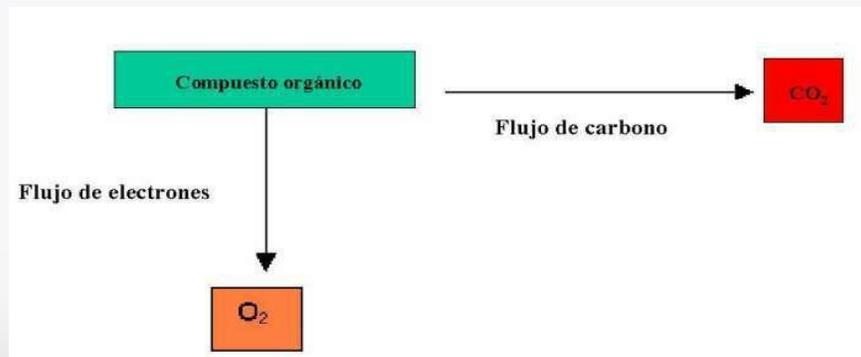
El proceso de respiración de la célula se describe como un proceso metabólico o de combustión, donde las moléculas con alto contenido energético se descomponen en moléculas mucho más simples, durante este proceso de degradación, se libera la energía almacenada dentro de las moléculas. Generalmente, la respiración celular se categoriza en dos tipos: aeróbica, que ocurre en presencia de oxígeno, y anaeróbica, que ocurre en ausencia de oxígeno.

4.8.1.1. Respiración aerobia

“Proceso por el cual se oxida un compuesto usando O_2 como aceptor de electrones” tal como se visualiza en la figura 10, (Bastardo y Pedrique, 2008).

Figura 10

Respiración aerobia

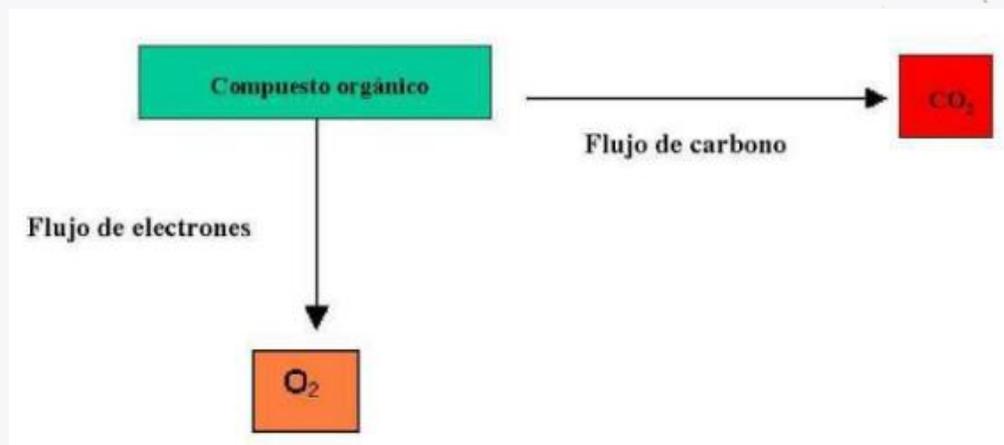


Fuente: Bastardo y Pedrique, 2008.

4.8.1.2. Respiración anaerobia

Esta forma de respiración celular se limita a organismos procarióticos específicos, como bacterias o arqueas, particularmente aquellos que prosperan en ambientes con oxígeno mínimo o nulo. A diferencia de la respiración aeróbica, que necesita oxígeno para la descomposición de las moléculas de azúcar, como se ilustra en la figura 11, la respiración anaeróbica utiliza diferentes elementos químicos o incluso compuestos orgánicos más complejos a través de una cadena de transporte de electrones. Es importante distinguir este proceso de la fermentación, ya que en esta última no interviene la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, tanto la respiración anaeróbica como la fermentación comparten la característica de ocurrir sin presencia de oxígeno (Raffino, 2020).

Figura 11. Respiración Anaerobia.



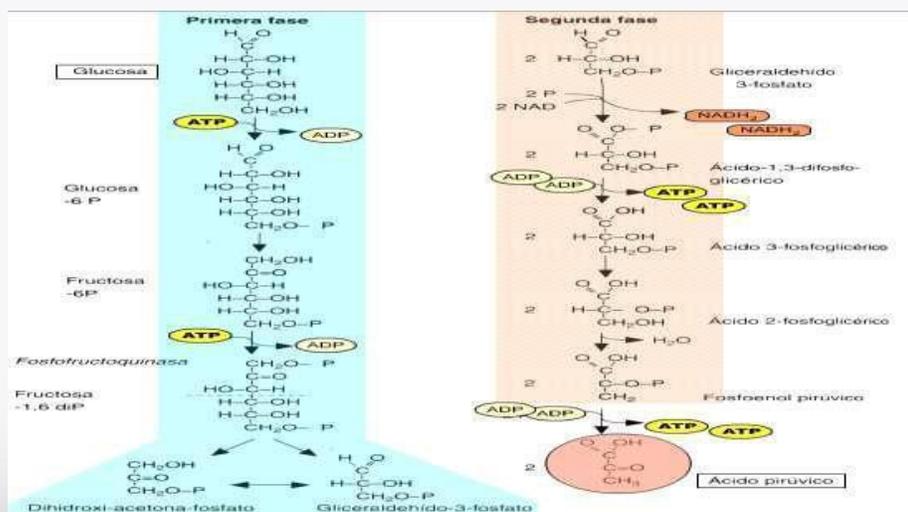
Fuente: Bastardo y Pedrique (2008).

4.9. Proceso de la Glucólisis

Según lo mencionado por Ángeles (2012) el ATP es uno de los transportadores más importantes de energía encaminado hacia los ciclos de vida producida por la glucólisis, como se visualiza en la figura 12, constituyendo una vía que se enfoca en las fases metabólicas que realizan gran número de organismos vivos. La combustión de la glucosa requiere de un ambiente aeróbico, sin embargo, algunas células deben sobrevivir en ambientes donde el oxígeno es escaso o no está continuamente disponible. Según

argumentos sólidos, se sugiere que las primeras células en aparecer en la tierra evolucionaron en una atmósfera sin la presencia de este gas. En consecuencia, tuvieron que encontrar la forma para extraer y encontrar energía de fuentes de combustibles sin ser dependientes del oxígeno. De igual manera, actualmente las células mantienen la capacidad enzimática para realizar la glucólisis, catabolizando la glucosa sin necesidad de oxígeno, en un proceso denominado como la ruptura anaeróbica de la glucosa. Un claro ejemplo es la fermentación alcohólica para la producción de Etanol (Alcohol etílico) y bióxido de carbono, mediante la glucólisis, las células de levadura en una botella de champaña taponada obtienen energía en la ausencia de oxígeno y se mantienen con vida. La glucólisis es utilizada por las células musculares que tienen sobrecarga para cubrir sus necesidades de energía, llevando a cabo un proceso de fermentación láctica para generar ácido láctico. No obstante, estas células en su mayoría tienen la capacidad de utilizar oxígeno para degradar la glucosa. De esta manera, los resultados finales son los que se dan al combustionar o quemar la glucosa en lugar de llevar a cabo su proceso de fermentación, al igual que la producción de CO₂ y H₂O. Teniendo en cuenta la ruptura anaeróbica de la glucosa, se requiere de una serie de once reacciones enzimáticas que se encuentran catalizadas secuencialmente, las cuales son llevadas a cabo en el citosol y se requiere de ATP y NAD como reguladores.

Figura 12 *Glucolisis*



Fuente: Gonzales y Raisman, 2005.

4.9.1. Vías metabólicas alternas para generar energía

En la composición de los alimentos, predominan hidratos de carbono, grasas y proteínas, las cuales son combinaciones de compuestos químicos y cada uno es sometido a procesos metabólicos que se conectan con el ciclo de Krebs, centrado en el metabolismo celular. Por ejemplo, los polisacáridos se desintegran en monosacáridos y luego se fosforila para formar glucosa-6-fosfato, siendo este un paso inicial en la vía celulítica; dentro de los polisacáridos principales se destaca el almidón. Mientras tanto, las grasas se descomponen inicialmente en ácidos grasos y glicerol. En el proceso conocido como oxidación, tanto en las mitocondrias como en los peroxisomas, los ácidos grasos son descompuestos en moléculas de dos carbonos; estas moléculas ingresan al ciclo de Krebs como acetil-CoA. Paralelamente, las proteínas pasan por un proceso de desintegración en sus aminoácidos constituyentes, quienes luego experimentan la diseminación. El esqueleto restante de carbono se convierte en uno de los compuestos del ciclo de Krebs de la vía celulítica y también se puede transformar en un grupo acetil, facilitando su posterior procesamiento en esta fase central del metabolismo. Por otra parte, los grupos aminos son eventualmente excretados como compuestos nitrogenados, si no son reciclados y la mayor parte de los procesos catabólicos es constituida por un conjunto de vías encargadas de los procesos de degradación.

4.9.1.1. Vía metabólica de Entner-Doudoroff.

Esta vía metabólica sirve como una ruta alternativa donde la glucosa se descompone en piruvato mediante una secuencia de reacciones enzimáticas distintas de las vías de la glucólisis y de las pentosas fosfato. Representa el método principal de catabolismo de la glucosa para microorganismos aeróbicos obligados que no poseen fosfofructocinasa, lo que los hace incapaces de producir fructosa-1,6-bifosfato. Los microorganismos notables que utilizan esta vía incluyen: *Azotobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Neisseria sp.*, *Rhizobium sp.*, y *Agrobacterium sp.*

4.9.1.2. Vía de las pentosas fosfato o vía de las pentosas Deshunt

Conocida como vía del fosfogluconato, esta ruta metabólica está asociada con la glucólisis y utiliza glucosa para generar ribosa, que es esencial para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Además, es importante reconocer que esta vía no sólo aprovecha la glucosa para obtener energía, sino que también emplea la fermentación de hexosas, pentosas y varios carbohidratos. En ciertos microorganismos, por ejemplo, en los fermentadores heterolácticos, esta vía sirve como fuente de energía primaria; no obstante, su uso primordial se enfoca en generar NADPH en la mayoría de los microorganismos, brindando el poder de reducción para las reacciones que se producen de manera biosintética. La vía pentosa se comprende en el citosol celular y se clasifica en las siguientes fases:

Fase oxidativa: el NADPH es generado

Fase no oxidativa: pentosas-fosfato y otros monosacáridos- fosfato pasan a ser sintetizados

4.10. Proceso metabólico del ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs

En el libro de la autoría de Cardellá (2007) se define el ciclo de Krebs, abarcando un campo general desde su función mínima, hasta sus reacciones más complejas. Este ciclo es metabólico dando inicio por uno de los últimos productos en glúcidos, aminoácidos y lípidos, aminoácidos este producto final es el acetyl-CoA. Este sustrato es el responsable de la liberando energía que se captura en cofactores reducidos (1 FADH₂ y 3 NADH), además de 1 GTP y la producción de 2 moléculas de CO₂, resultado de la degradación del sustrato de manera gradual dentro del ciclo, como se observa en la figura 12. De la misma manera, es una ruta que tiene una relación con distintos procesos con metabolismo anabólico de proteínas, lípidos, glúcidos, porfirinas, ácidos nucleicos, etc., lo que la titula como vía o ruta central del metabolismo.

4.10.1. Fases y proceso claves del ciclo de Krebs.

Es una fase de catabolismo pues, el acetil-CoA, quien es el proveedor de alimentos se desintegra y produce 2 CO₂, en un compuesto un poco más pequeño, y sus H pasan a ser parte de los cofactores reducidos. También, se genera GTP, con una cantidad de energía igual a la del ATP

4.10.2. sitio de acción de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs)

La mayoría de las enzimas necesarias para llevar a cabo este proceso metabólico tiene lugar específicamente en la matriz mitocondrial en donde ocurre el ciclo. Además, las mitocondrias también son responsable de otros procesos, lo que la señala como eje central y su localización asegura una máxima eficiencia conforme a los “principios de la máxima eficiencia” o de la bioquímica; dentro de las responsabilidades mitocondriales también hacen parte los procesos de respiración celular que, mediante la utilización de cofactores reducidos generado por el ciclo, complementan la cadena de respiración. A nivel histológico, el ciclo excluye los glóbulos rojos carentes de mitocondrias, es decir, que se presenta en todos los tejidos que poseen estas organelas celulares.

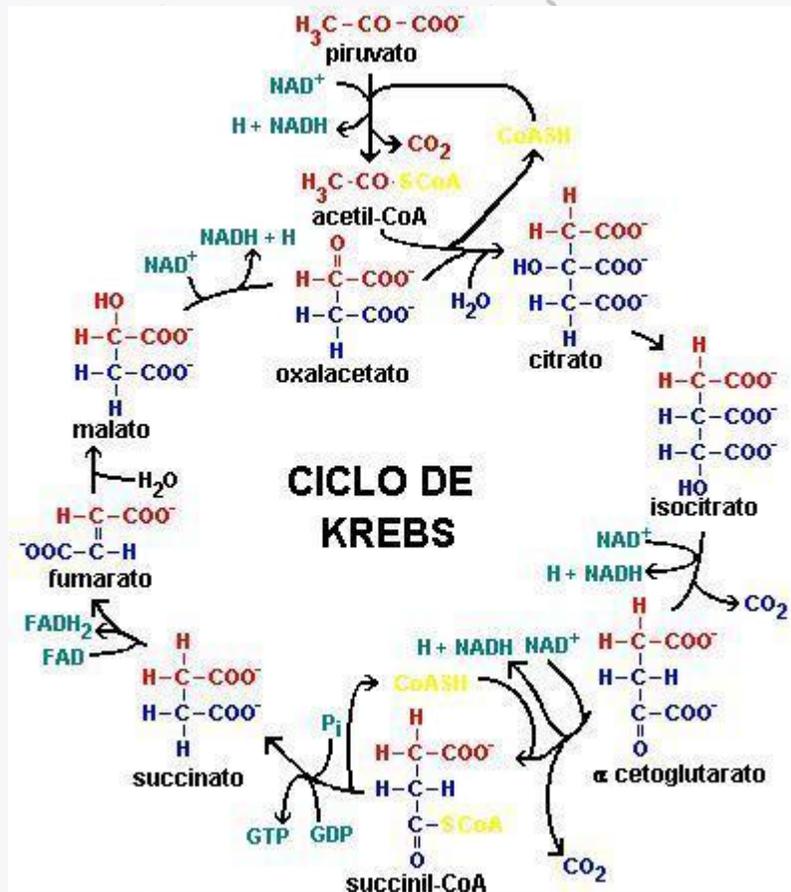
4.10.3. Descripción general de las etapas metabólicas de los ácidos tricarboxílicos

Consta de un número total de 8 reacciones, cada una de las cuales se cataliza por enzimas, como se ejemplifica en la figura 13. El proceso comienza con la entrada de acetil CoA (a), que se condensa con ácido oxalacético; una reacción esencial implica la formación de GTP mediante la fosforilación a nivel de sustrato. Esta vía es de naturaleza cíclica, ya que el ácido oxalacético, producido en el paso final, la reacción 8, vuelve a servir como sustrato para la reacción inicial. Si bien este ciclo es generalmente irreversible, ciertas reacciones dentro de él pueden revertirse. En el ciclo de Krebs, el grupo acetilo, bicarbonatado, unido a la CoA experimenta una oxidación secuencial, resultando en la producción de 2CO₂ en

cada ciclo; además, los factores de la vía incluyen la formación de un GTP y los cofactores reducidos (3NADH.H+ y 1FADH2).

Figura 13

Ciclo de los ácidos tricarboxílicos



Fuente: Gonzales, 2007.

4.10.4. Funcionalidad de los ácidos tricarboxílicos

Este ciclo cumple con dos funciones vitales. En primer lugar, generan cofactores reducidos que sirven como alimento por medio de sustratos para la cadena respiratoria y contribuyen en la generación de ATP. La fase número dos se lleva a cabo a partir de sus

intermediarios metabólicos, que establecen conexiones fundamentales con el metabolismo de material genético, proteínas, hemoproteínas, lípidos y glúcidos, todo esto mediante la sintetización de compuestos como los ácidos grasos, aminoácidos y grupos hemo; sin dejar de lado, la conexión estrecha que comparte con otros procesos celulares en la cadena respiratoria.

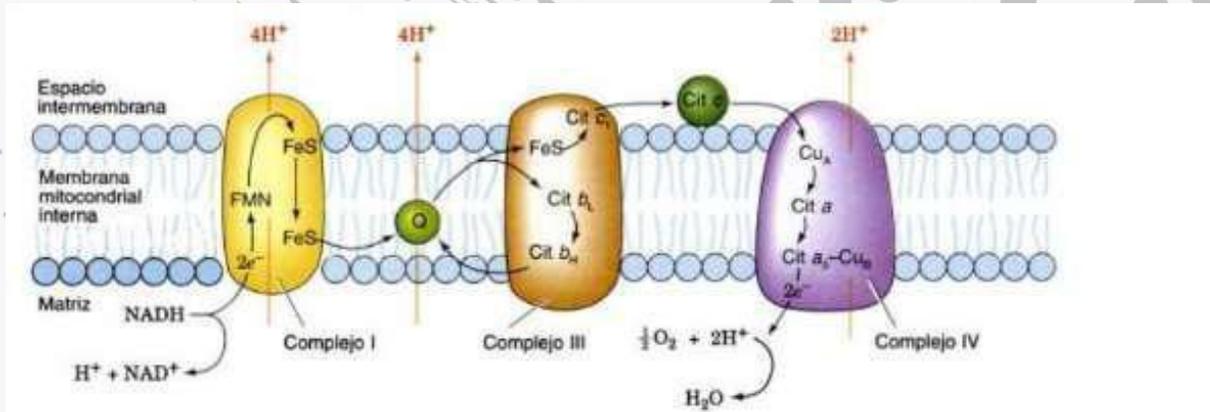
4.11. Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa

Según lo mencionado por Voet y Voet (2006), los electrones de alta energía están presentes en el NADH y FADH₂ generados durante la glucólisis, así como en la degradación de ácidos grasos y aminoácidos y en el ciclo del ácido cítrico. El proceso de fosforilación oxidativa implica la oxidación de estas moléculas, transfiriendo sus electrones al O₂, y la energía resultante utilizada para la síntesis de ATP, que ocurre dentro de las mitocondrias.

4.11.1. Cadena transportadora de electrones

Incrustado dentro de la membrana mitocondrial hay una colección de complejos enzimáticos que oxidan NADH y FADH₂, creando un gradiente de protones, como se observa en puede ver en la figura 14. Es importante señalar que la cadena de transporte de electrones mitocondrial está formada por varios transportadores electrónicos, predominantemente proteínas integrales de membrana, que poseen grupos protésicos que pueden aceptar o liberar uno o dos electrones. A medida que los electrones se mueven a través de estos complejos, los protones son bombeados al espacio intermembrana. Este bombeo de protones que se mueve por la cadena de transporte de electrones genera una fuerza motriz de protones, resultante de los efectos combinados de los potenciales químicos y eléctricos.

Figura 14
Cadena transportadora de electrones



Fuente: Voet y Voet, 2006.

En este proceso, se realizan 3 tipos de transferencias por parte de los transportadores:

1. Transferencia de electrones de forma directa (típicamente relacionada con metales)
2. Transferencia de átomo de H, donde se transfiere un protón (H^+) junto con un electrón (e^-) $\rightarrow H^+ + e^-$
3. Transferencia de ion hidruro, formado por la acción de dos electrones ($2e^-$) a protón (H^+) $\rightarrow H^-$ ($H^+ + 2e^-$)

Las moléculas transportadoras de electrones son 5:

1. NAD^+ y $NADP^+$.
2. Flavoproteínas.
3. Ubiquinona.
4. Proteínas Ferro-sulfuradas
5. Citocromos

4.11.1.1 Complejos de la cadena de transporte

4.11.1.1.1. NADH deshidrogenasa o complejo I

NADH deshidrogenasa facilita la catalización acoplada de dos procesos de forma simultánea: la expulsión de un número de 4 protones de la matriz direccionada al espacio intermembrana y la transferencia de un protón e hidruros a la ubiquinona. Funciona como una bomba de protones que los desplaza hacia una dirección definida que es impulsada por la transferencia de electrones para catalizar una reacción vectorial. La transferencia de electrones en los centros Fe-S es bloqueada por los inhibidores de este complejo.

4.11.1.1.2. succinato deshidrogenasa o Complejo II

Es una proteína que está localizada en la cara interna de la membrana mitocondrial, orientada hacia la matriz, y participa en el ciclo del ácido tricarboxílico y es la única proteína periférica en esta fase del ciclo. Su función principal es transferir electrones del succinato a la ubiquinona (Q) utilizando una molécula de FAD, tres centros Fe-S y un citocromo b; Aunque los complejos NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa y funcionan de manera no secuencial, ambos tienen el objetivo común de transferir electrones del sustrato reductor a la ubiquinona.

4.11.1.1.3. ubiquinona-citocromo c oxido-reductasa o Complejo III

En el proceso determinado ciclo Q, esta proteína periférica tiene la facultad para transferir electrones desde ubiquinol (QH₂) hasta el citocromo C, mientras que simultáneamente tiene la tarea de transportar protones (H⁺) que van desde la matriz hasta el espacio de la intermembrana.

4.11.1.1.4. citocromo oxidasa O Complejo IV

Esta enzima facilita la transferencia de electrones del citocromo C al oxígeno molecular, resultando en la formación de agua. Durante esta fase, la enzima se gasta 4 protones (H^+) en la matriz para reducir el O_2 a H_2O ; también, utiliza la energía liberada en la reacción para bombear un protón (H^+) a cada espacio intermembrana, participando así en el transporte de electrones. Este mecanismo previene la generación de radicales de oxígeno al mantener el intermedio unido hasta su completa conversión a agua.

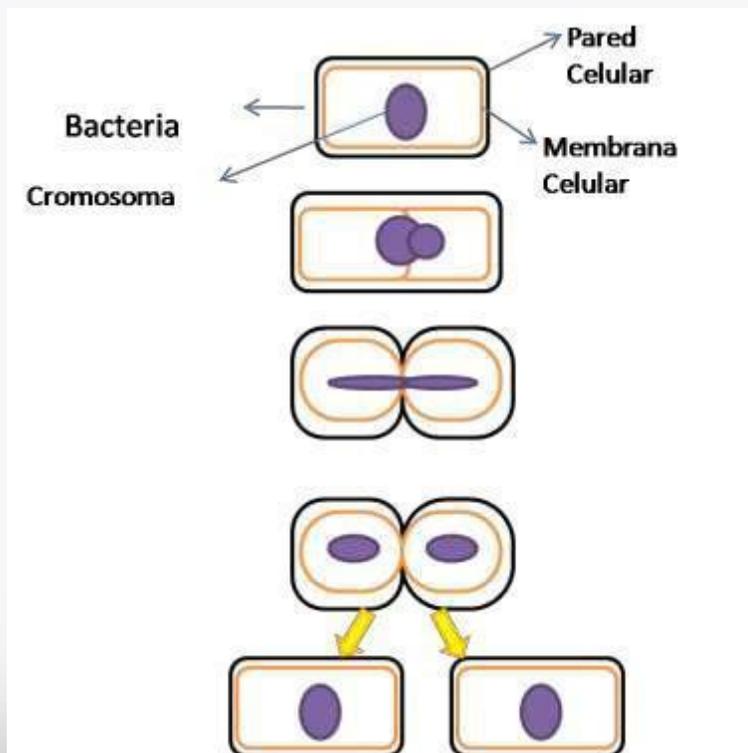
UNIDAD 3: PROLIFERACIÓN MICROBIANA

5. Proliferación microbiana

Según CEUPE (2020), que detalla el proceso de crecimiento microbiano y clasifica la curva de crecimiento en cuatro fases distintas (consulte la figura 16), es importante señalar que la división celular es la fuerza impulsora detrás del crecimiento, lo que representa un aspecto crucial de la vida de una célula microbiana. El término crecimiento microbiano se refiere al aumento del número de células dentro de una población, además este proceso implica llevar a cabo una fisión binaria que depende de al menos una célula viable presente, de lo contrario el crecimiento es nulo. Un ejemplo simple es la división de una célula madre bacteriana en dos células hijas mediante fisión, quienes continúan con su ciclo de crecimiento.

Figura 15.

Fisión binaria



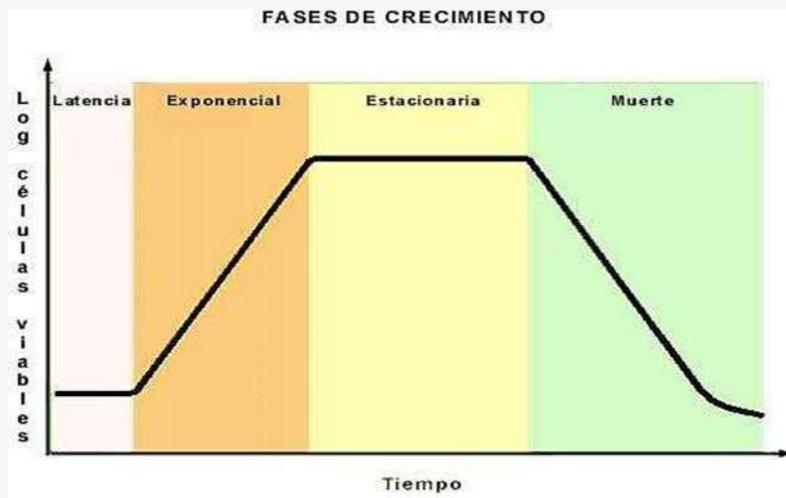
Fuente: García, 2013.

En un entorno con las condiciones óptimas que permitan satisfacer las necesidades microbianas, los microorganismos presentan tiempos de duplicación cortos; durante cada periodo de duplicación, una célula pasa por un proceso que implica su división con el fin de formar dos células, repitiendo el proceso de manera exponencial, con un número de cuatro células luego de duplicación, ocho después de tres periodos y su incremento se va elevando. De esta manera, la tasa de crecimiento y la totalidad de células se duplica en cada periodo de duplicación sucesivo.

La curva que determina el crecimiento de un cultivo de microorganismos se establece en etapas distintas, como es planteado en la gráfica 1.

Gráfica 1

Etapas de la curva de crecimiento microbiano.



Fuente: García, 2014.

Fase latencia: En esta etapa inicial, los microorganismos se ajustan a las condiciones ambientales en las que se encuentran. Aquí, el número de microorganismos pueden mantenerse constantes o decrecer, antes de que empiece su multiplicación activa una vez adaptados.

Fase exponencial: Los microorganismos en esta etapa presentan una rápida multiplicación, aumentando exponencialmente en número debido a los cortos períodos de duplicación.

Fase estacionaria: En esta etapa, los microorganismos alcanzan un equilibrio entre la reproducción y la muerte de estos, esto ocurre cuando los nutrientes primordiales son agotados o se acumulan los metabolitos que participan en la inhibición del crecimiento microbiano; permitiendo que estos puedan mantener una relativa constancia en esta fase.

Fase de muerte: En esta etapa, el número de células que mueren es mayor a las células nuevas que se forman, ya que las condiciones no permiten un crecimiento continuo.

5.1. Factores determinantes en la proliferación microbiana

De acuerdo con Cervantes et al., (2017) diversos factores influyen en la proliferación de los microorganismos, entre estos factores se destacan los elementos y sustratos que se requieren para el desarrollo microbiano, así como el impacto y la importancia de variables como el agua, luz, temperatura, oxígeno, pH, oxígeno, como se visualiza en la siguiente figura:

Figura 16

Factores del ambiente y crecimiento de los microorganismos



Fuente: Anmat, s.f.

5.1.1. Elementos requeridos por el microorganismo para su desarrollo

Los microorganismos requieren de vitaminas para la obtención de energía y de una variedad de elementos para llevar a cabo su desarrollo, que varían según su especie; en general, requieren elementos esenciales como azufre, fósforo, nitrógeno, carbono, hidrógeno y oxígeno, otros elementos posiblemente esenciales como cloro, potasio, sodio, hierro magnesio y calcio; Además ciertos elementos son importantes para la proliferación de algunos microorganismos, entre ello se destaca el zinc, cobre, yodo, sílice y molibdeno.

5.1.2. Sustratos para el crecimiento

En su entorno de crecimiento, los microorganismos satisfacen sus necesidades alimenticias por medio de sustratos que tienen disponibles. Mientras que los compuestos

alimenticios se disuelven rápido, los complejos requieren de la activa participación de enzimas extras que dependen de la temperatura, la influencia de metales pesados o sales neutras, así como el tiempo de exposición y pH, juegan un papel complejo y crítico en la actividad enzimática. Estas enzimas facilitan la catalización de la hidrólisis de los compuestos, convirtiéndolos en sustancias solubles y simplificadas que son aptas para la absorción, las cuales son productos elaborados por hongos y bacterias

5.1.3. Influencia del agua sobre el crecimiento

El desarrollo bacteriano depende de la presencia del agua, ya que estas pueden crecer en condiciones húmedas más elevadas en comparación con los hongos. El agua es quien facilita el transporte de los nutrientes disueltos hacia sus células, además, permite que los desechos sean eliminados y mantienen la humedad que necesita en su entorno.

5.1.4. Influencia de la temperatura

La presencia simultánea de bacterias y hongos, tienen la capacidad de adaptarse y prosperar en un grado térmico que va desde 0 hasta 65°C, manteniendo esta capacidad durante largos períodos. Es por ello, que la temperatura es el factor determinante para el crecimiento y viabilidad microbiana.

5.1.5. Influencia o del oxígeno y la luz

Algunos hongos necesitan oxígeno para su desarrollo y luz para llevar a cabo su reproducción con normalidad; la luz UV puede tener efectos varios sobre estos, los cuales incluye el estímulo, inhibición o muerte, estas van regidas por factores como el tiempo de exposición, las longitudes de ondas y la especie involucrada. Algunas setas poseen pigmentos oscuros en su micelio, que aparentemente los protegen de esta luz. Por otra parte, las bacterias pueden presentar menor resistencia a la luz UV debido a que los hongos poseen esporas que les permiten ser más resistentes. En el caso de las bacterias anaeróbicas poseen la facultad para crecer en ausencia de oxígeno, mientras que las facultativas anaerobias pueden sobrevivir en presencia y en ausencia de éste, por otra parte, las

aeróbicas dependen del oxígeno y las autotróficas utilizan el dióxido de carbono requerido para su desarrollo.

5.1.6. Influencia del pH

El pH juega un papel fundamental en el desarrollo microbiano. Tanto los hongos como las bacterias cuentan con la facultad para desarrollarse en pH bajos (1.0 y 3.0) y ambos microorganismos son capaces de modificar el pH mediante productos que secretan durante su desarrollo, para medios no amortiguados. Sin embargo, algunas especies bacterianas requieren de un pH de 8.5 o superior, pero su pH óptimo para la mayoría va desde 6.0. Los hongos, prefieren entornos ácidos y prosperan en un pH hasta de 8.5.

5.2. Etapas y regulación de la división celular

Gonzales (2013) sostiene que la división celular es el proceso mediante el cual la célula considerada

como madre da lugar a 2 células hijas que son idénticas tanto entre sí, como a la célula madre de la cual provienen. Este mecanismo es fundamental para la multiplicación de los organismos unicelulares, así como para la proliferación y reconstrucción de órganos y tejidos en organismos pluricelulares. Este proceso está dividido por dos fases en secuencia:

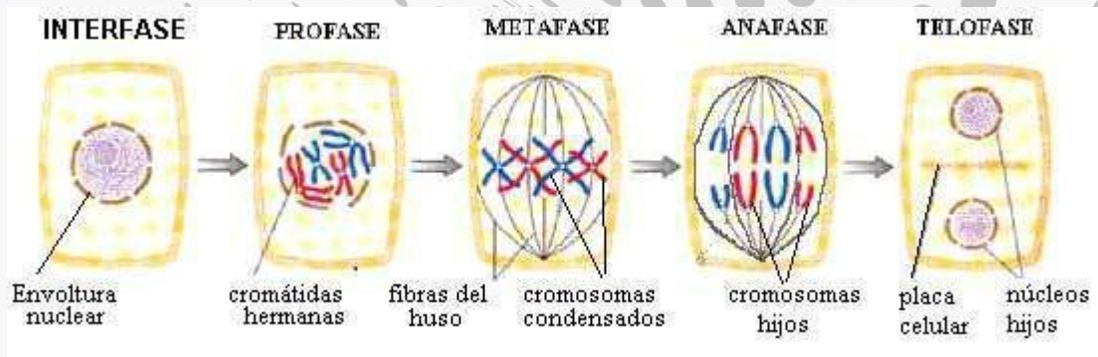
5.2.1. Proceso Mitótico o cariocinético (división nuclear)

Gonzales (2013) señala que el proceso mitótico es continuo, que se ha subdividido tradicionalmente en un número de etapas como se muestra en la figura 17:

1. Profase
2. Metafase
3. Anafase
4. Telofase

Figura 17

Mitosis



Fuente: Gonzales, 2013).

Profase (pro: primero, antes). Cada cromosoma consta de dos cromátidas unidas solamente en el centrómero; estas estructuras comienzan a visualizarse como filamentos extensos dobles, engrosados y acortados. Durante esta fase, cada uno de los cromosomas adoptan una forma compacta adecuada para su transporte y dejan a un lado su configuración laxa de trabajo. Por otra parte, los nucleolos desaparecen se distribuyen en forma de ribosoma en el citoplasma; esto sucede debido a que la envoltura nuclear se fragmenta en cisternas que se confunden con el retículo endoplasmático.

Metafase (meta: después, entre). En esta etapa, los cromosomas se condensan y se acortan lo máximo posible. Debido a la composición microtubular de haces, se forma el huso acromático o también llamado mitótico; a través de cinetocoro (estructura proteica laminar, presente en ambos lados del centrómero), alguno de estos microtúbulos se conecta al cromosoma y otros se solapan en la zona ecuatorial celular, estos son más largos e identificados como polares. Este proceso continua hasta que el número total de centrómeros se alineen en un plano ecuatorial y se dupliquen ellos mismos, lo que conduce a su posterior división.

Anafase (ana: arriba, ascendente). Los cromosomas hijos, originados por la separación de los centrómeros hijos se dirigen hacia los polos celulares, un proceso facilitado por el

huso mitótico quien es el encargado de organizar y asegurar la distribución adecuada de los cromosomas hijos en los núcleos que son descendientes, facilitado por la acción de los microtúbulos cromosómicos los cuales están unidos al cinetocoro luego de haber sido cortado en los extremos. Por otra parte, los microtúbulos polares se alejan de los dos grupos de cromosomas hijos facilitando su separación, mediante el desplazamiento en direcciones distintas.

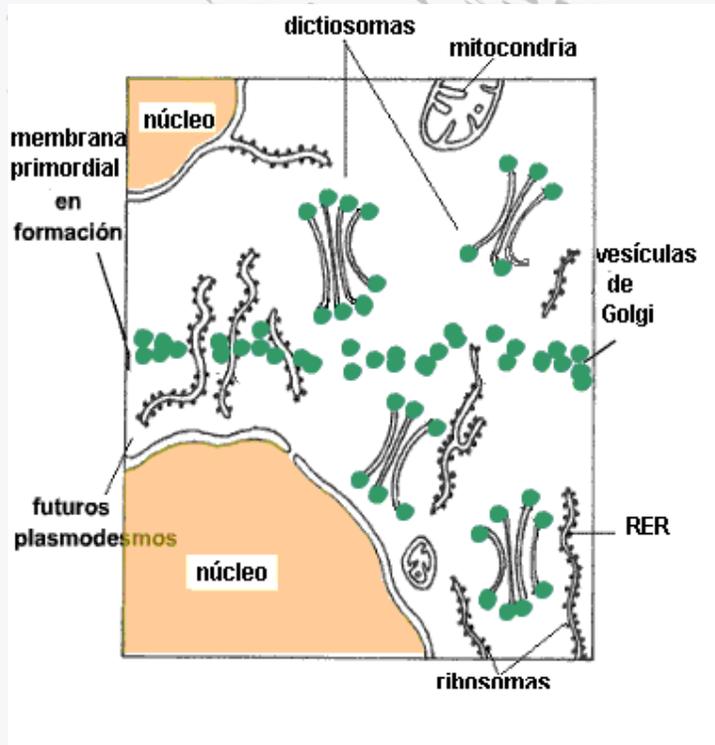
Telofase (telos: fin). El proceso se inicia cuando los cromosomas hijos alcanzan los polos de la célula. Una vez allí, los cromosomas hijos se estiran y pierden su estado condensado, mientras que la envoltura nuclear se vuelve a ensamblar a partir del retículo endoplásmico rugoso y el nucléolo emerge de la región encargada de la organización del nucléolo de los cromosomas SAT.

5.2.2. Citocinesis (reparto del contenido del citoplasma y orgánulos celulares)

Según Gonzales (2013), la citocinesis, definida como la división del citoplasma, tiene lugar tras la división del núcleo en dos núcleos hijos durante el proceso mitótico. En las plantas superiores, una estructura conocida como fragmoplasto emerge en el ecuador de la célula en el punto de la telofase tardía. Esta estructura está cargada por 2 conjuntos de microtúbulos con polaridad opuesta que se superponen en sus extremos al interior del plano de la división y se generan al ritmo que el huso acromático se va desvaneciendo. Entre los microtúbulos se desarrollan un número extenso de dictiosomas que se pegan para crear una cisterna grande que contiene los polisacáridos esenciales para formar la laminilla media y la fase amorfa de la pared primaria (figura 18).

Figura 18

Citogénesis.



Fuente: Gonzales, 2013.

5.3. Etapas de división bacteriana a nivel celular

Los procariontes, destacando las bacterias, se propagan mediante su división celular, denominada fisión binaria. Los organismos unicelulares sólo pueden producir nuevos individuos mediante división celular. En ambas células, procariotas y eucariotas, el producto de la reproducción celular es un par de células hijas que a nivel genético son iguales a la célula madre, estas células hijas son individuos. El proceso de división celular en procariotas se llama fisión binaria y es mucho más sencillo y rápido que la división celular en eucariotas. Debido a que las células bacterianas se dividen tan rápidamente, sus poblaciones crecen de la misma manera. El ADN de los cromosomas circulares bacterianos no está contenido en el núcleo celular, al igual que el ADN nuclear de los eucariotas está asociado con proteínas que ayudan a comprimir la molécula de ADN a un

tamaño mínimo. Las proteínas "Zip" presentes en los procariotas están relacionadas con las de los eucariotas (Cnx Bio, 2018).

5.4. Función de las proteínas FTS Y MRB en la división celular

Como afirma Lago (2018), los genes conocidos como genes *ft* juegan un papel importante en la división celular. Cada uno de estos genes desencadena la síntesis de una proteína, lo que lleva a la creación de proteínas *fts*, las cuales son las encargadas de participar en el proceso de septación, donde se unen para formar un complejo multiproteico. La interacción entre las proteínas *Fts* da como resultado el ensamblaje del aparato de división denominado divisoma, como se ilustra en la Figura 18.

La tubulina forma una estructura dinámica a través de su interacción con GTP, sirviendo como citoesqueleto. *FtsZ* cumple una función similar a la tubulina, en el citoplasma existe una forma soluble de GDP-*FtsZ*, que puede unirse a la membrana y crear un anillo en el sitio de tabique en el centro al interactuar con GTP y transformarse en la forma GTP-*FtsZ*. Una vez que se establece este anillo, otras proteínas son atraídas hacia él, lo que lleva a la formación de un complejo multiproteico que inicia la contracción. En esta etapa, se activa la función GTPasa inherente a las proteínas *FtsZ*, lo que provoca el inicio de la despolimerización.

El anillo está formado por *FtsZ*, que atrae otras proteínas para crear el complejo y facilitar la contracción. En el citoplasma, *FtsA* existe en forma soluble y posee actividad ATPasa. Esta función permite que el anillo *FtsZ* y otra proteína, *FtsQ* interactúen entre sí.

Numerosas proteínas *Fts* se encuentran en el periplasma, y *FtsA* se encuentra en el citoplasma. *FtsQ*, que también es periplásmico, desempeña un papel en el inicio de la sinterización de peptidoglicano. Por el contrario, *FtsI* participa en la continuación de la síntesis de peptidoglicano más que en su inicio, y también está situado en el periplasma. Específicamente clasificada como PBP3, *FtsI* es una proteína fijadora de penicilina que se activa cuando se integra en la estructura del peptidoglicano, facilitando la síntesis del peptidoglicano septal.

FtsM trabaja en la elaboración de los fragmentos de peptidoglicano FtsW, provee primers para los demás componentes proteicos de la elaboración de peptidoglicano. FtsK es quien hace el papel de instructora o maestra para destruir o disociar las descendencias que tienen las células madre. ZipA hace parte de la etapa de septación, además de que establece la relación entre el aro anillar y la capa de grasa, su función primordial es la preservación del vínculo entre FtsA y FtsQ. Las proteínas Fts y la manera fundamental de separar las cosas es de suma importancia para conocerla debido a que las mismas no se hallan en los eucariotes, por esta razón son una zona sobre la cual es posible actuar selectivamente. Es posible concebir métodos para remover microorganismos.

Conforme a lo que se publicó Lago (2018), también se afirma que la proteína MreB tira hacia un lado el orbe O3, de esta forma, haciendo una separación con los orígenes. Al momento en que el DNA se repite y se marcha de la replisoma, esta fuerza de desplazamiento forza a los cromosomas descendientes a diferentes polos, esto es, la responsable es la misma acción de repetición.

La etapa que culmina la compactación que restaura el orden de los genes se lleva a cabo por un conjunto de proteínas parecidas a las topoisomerasas y a las proteínas SMC (que corresponden a las que se observan en la figura 19).

En la etapa de la replicación, si se utiliza un compuesto que antes de que comience la misma, se puede observar que los dos orígenes no se distinguen lo que lleva a la conclusión de que MreB está involucrada en este momento. En el momento en que los orígenes están diferenciados no tiene efectos la estratificación. Hay dos formas de iniciar la segregación: Al momento en que el DNA se reproduce y se marcha de la replisoma, esta fuerza de desplazamiento forza a los cromosomas descendientes a sitios diferentes, esto es, la responsable es la misma fuerza de reproducción. Hay dos formas de iniciar la segregación: la primera, dependiente de MreB (inicio), y la segunda, independiente de MreB.

Las funciones de MreB son:

- Ayuda a preservar la morfología de bacterias (la figura de coco no la tiene, las transformaciones se deben a la proteína en cuestión, de modo que la forma esférica es la forma común).

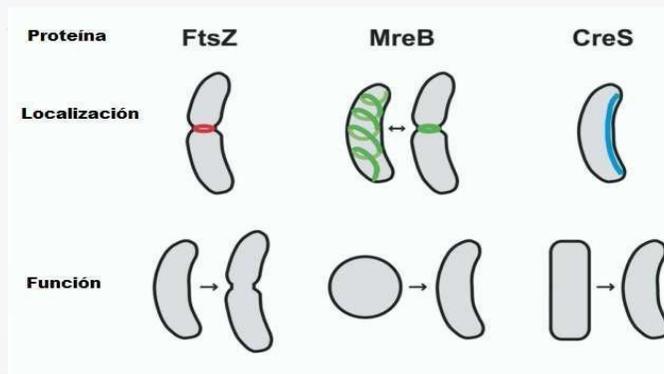
- Involucra en la agrupación, en el momento en que los especialistas en historia comenzaron a separar las causas.
- Involucrada en la posición de polaridad de proteínas. Ej: El desplazamiento al hemisferio norte es posible que se realice a manos de los filamentos de MreB, Caulobacter (quinás)

Para el fin, dentro de las células de E.C., el esqueleto de citoesqueleto es el director de los procedimientos de celularidad, forma, diferenciación, etc. Esta intrincada red de proteínas está formada por microfilamentos de actina, microtubulos y filamentos de tamaño medio, estos tienen un rol significativo dentro de la estructura de la piel de los seres humanos, consisten en componentes del citoesqueleto que son homólogos a las células eucariotas.

Las proteínas FtsZ y BtubA/B son homólogos de la tubulina, mientras que las proteínas MreB, ParM y MamK son homólogas de la actina. Por su parte, la proteína CreS (crecentina) está asociada con los filamentos de intermedio. La estructura organizacional y ensambla proteico es producto de una amplia diversidad morfológica a nivel microbiano, que conserva su estructura gracias a una pared celular rígida que funciona como un exoesqueleto.

Figura 19

Proteínas Fts y MreB.



Fuente: Roca, 2020.

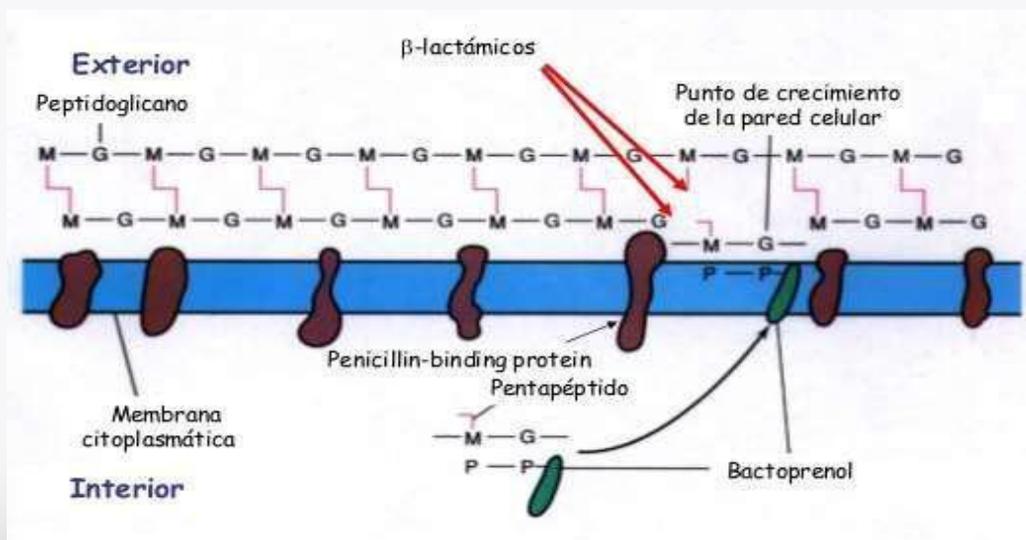
5.5. Procesos biosintéticos del peptidoglicano.

Las unidades constantes del peptidoglicano se producen dentro deloplasma, en tanto que se encuentran unificadas al nucleótido UDP; luego son trasferidas a una sustancia lipídica transportadora que la hace moverse a través de la membrana. Después de ello, se polimerizan y dan un peptidoglicano en la superficie externa de la membrana, a manos de en enzimas que se encuentran a nivel externo superficial como se ilustra en la figura 20.

El peptidoglicano se diferencia de los otros biopolímeros analizados hasta el momento debido a que es un tejido bidimensional en vez de una cadena de componentes, que entierra a la célula como si fuera una bolsa. Por esta razón, su sinterización requiere que las unidades que se repiten sean unidas de manera química en dos dimensiones. La constitución de los sacos de peptidoglicano de todas las bacterias es similar, salvo en la manera en que están compuestos los aminoácidos dentro de las cadenas tetrapeptídica y en la regularidad y cantidad de los vínculos dentro de las diferentes cadenas tetrapeptídica (Stanier *et al.*, 1992).

Figura 20

Biosíntesis de peptidoglicano



Fuente: Rojas, 2015.

5.6. Métodos cuantitativos para determinar el crecimiento microbiano

Crecimiento exponencial: este estilo de crecimiento se produce cuando el número de individuos de la población de bacterias aumenta en duplicado en una franja de tiempo específica. Conocida de igual manera como la tasa de crecimiento uniforme y la tasa de crecimiento logarítmica. Para que esto ocurra, la bacteria debe desarrollarse en un ambiente propicio, sin restricciones de nutrientes y sin desechos tóxicos.

- El lapso de generación es igual.
- El incremento en el número de células es una secuencia de base dos que se incrementa de forma geométrica.

La figura de la representación de esta transformación en potencia matemática es una pendiente que crece constantemente. Si se visualiza en términos de escala de gradiente, se logra una línea recta. A través de la figura semilogarítmica es posible obtener la magnitud de una secuencia de cifras que tienen relación con el crecimiento, como por ejemplo el tiempo de generación (g).

$$g = t / n$$

n = es el número de veces que los miembros de una generación se producen en un período de tiempo t.

5.7. Métodos para medir el incremento de las poblaciones microbianas en el número de células

Láñez (1998) comenta que la proliferación de un cultivo bacteriano es posible medir el incremento en número de células o el aumento de su masa, como se visualiza en la figura 21. Estas dos formas de expresión muestran cómo los componentes crecen de manera uniforme en el mismo intervalo de tiempo, es decir, balanceado.

Figura 21.
Población de microorganismos



Fuente: Benito, 2015.

5.7.1. Cuantificación celular de la masa bacteriana

5.7.1.1. Enfoques directos

En estas técnicas es necesario utilizar preparaciones con procedencia conocida, sin partículas extrañas y completamente limpias.

Medición de peso húmedo: Este proceso se registra por el peso del sedimento obtenido, mediante centrifugación, en el cual se taran sus tubos. Posteriormente el cultivo bacteriano pasa por al proceso de centrífuga y su sobrenadante es eliminado para finalmente ser pesado.

Inconvenientes: Se pueden cometer variedad de errores, que van desde la manipulación de los equipos y de las cepas, hasta la retención líquida intracelular cuya cantidad varía según las características de las cepas bacterianas, entre otros.

Medición del peso seco: En este método, similar al anterior descrito, representa entre el 10% y el 15% del peso húmedo. En esta fase se necesita llegar a un peso constante, en donde el sedimento se seca a 105°C toda la noche, antes de ser pesado

Inconvenientes: Este método puede inducir a varios errores y demandar mucho tiempo. Utilizando una balanza de laboratorio es complicado llegar a menos de 1 mg exactos, en peso seco esto equivale en número de bacterias aproximadamente a 5×10^9 bacterias.

Medición del nitrógeno total: se lleva a cabo a través de una titulación y digestión ácida utilizando la técnica de micro-Kjeldahl.

Identificación de componentes principales: DNA, peptidoglicano, RNA, proteínas, entre otros.

5.7.1.2. Enfoques indirectos

Permite medir los nutrientes consumidos o de producción por unidades de tiempo de los metabolitos. Ejemplos: consumo de oxígeno y carbónico (QO_2 y QCO_2), que se determinan mediante respirómetro de Warburg.

Métodos turbidimétricos (ópticos): Se basa en medir la cantidad de luz que se dispersa o se transmite en un cultivo microbiano

Cuantificación de luz transmitida:

McFarland standards: Consta de una serie de patrones contenidos en tubos de vidrio completamente sellados con una mezcla del 1% de Cl_2Ba (cloruro de bario) en su interior y cantidades variables de SO_4H_2 (Ácido sulfúrico) al 1%, en cada uno de estos tubos se forma un precipitado de SO_4Ba el cual es el responsable de la turbidez observada. Para cada cepa estudiada se determina la relación entre la turbidez observada en cada tubo y la concentración o masa en bacterias (células/ml) que genera una turbidez equivalente.

Inconveniente: Este método se ha dejado a un lado por la espectrofotometría, ya que Macfarland es exacto pero muy poco preciso

Espectrofotómetro: Cuantifica la cantidad de luz absorbida por las muestras, es decir, su densidad óptica

Nefelómetro: Se encarga de medir la luz dispersada directamente por la muestra debido a un sensor posicionado de manera perpendicular en dirección a la luz incidente, lo que lo hace más sensible que el espectrofotómetro.

5.7.2. Cuantificación numérica de individuos

5.7.2.1. Técnicas directas

Cámara de recuento de Petroff-Hauser: Se compone de una lámina especial con una superficie graduada con medidas específicas; cuenta con una profundidad excavada de 0.02mm y 1mm² total de su área. Esta lámina está dividida por cuadrículas, en primer lugar, el área se divide en 25 cuadros grandes y cada uno de ellos se divide en 16 cuadros más pequeños, en total esto crea 400 pequeñas áreas en donde se puede esparcir la muestra. Para usar el cámara primero se coloca una muestra entre lámina y laminilla, luego se deja reposar por unos minutos en la plataforma del microscopio para que las células se asienten y sean visibles. Después se cuenta el número de células en varios de los cuatro pequeños. Este recuenta presenta una estimación del número de células, en donde su concentración se establece mediante la siguiente fórmula:

$$N \times 25 \times 50 \times 1000 = \text{concentración en células/ml.}$$

Cuantificación en preparaciones que se teñen: Se utiliza una lámina con una pequeña cavidad circular de área A_t y volumen (v) identificado, la muestra se coloca en esta cavidad con una micropipeta o con un asa para siembras y luego con ayuda de un colorante

se tiñe. Después se examina con un microscopio equipo con un campo visual definido A_c , si se encuentran n bacterias en ese campo visual, por mililitros la concentración bacteriana se establece de la siguiente forma:

$$n \cdot A_t / A_c \cdot 1/v$$

cuantificación en proporción de Wright: Es un método que se usa en su mayoría en las áreas virológicas. Para llevar a cabo su procedimiento, se mezcla una suspensión de bacterias con una cantidad precisa de glóbulos rojos con una concentración conocida o bolitas de látex. La determinación de la concentración bacteriana se determina según la proporción bacteriana y corpúsculos visibles en el mismo objetivo y campo del microscopio.

Contadores electrónicos de partículas (tipo Coulter): En este método la suspensión bacteriana fluye por un tubo delgado conocido como capilar entre dos electrodos. La corriente eléctrica se interrumpe momentáneamente cada vez que una partícula como lo son las bacterias atraviesa un pequeño orificio de aproximadamente 30mm. Estas interrupciones son registradas para determinar el tamaño y número de partículas mediante un dispositivo eléctrico

Últimamente se ha estado utilizando la citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), aquí las partículas las partículas de interés son marcadas con un anticuerpo monoclonal u otro ligando particular dirigidos a moléculas de superficie, los cuales están enlazados a sustancias que generan fluorescencia cuando es expuesta a un haz de luz, llamados fluorocromo.

5.7.2.2. Técnicas indirectas:

Estos enfoques sólo cuantifican las bacterias viables, lo que necesariamente no coincide con el número bacteriano total.

Método del número más probable: Las partículas se en varias muestras iguales de forma aleatorias en función de la cantidad medida de partículas en la suspensión; todo esto se basa en la distribución de Poisson

$$PX = mX \cdot e^{-m/x!}$$

En donde se tienen en cuenta:

- x: Cantidad total de partículas reales en cada muestra.
- m: concentración de partículas (número de partículas por unidad de volumen)

Se toman porciones pequeñas de la suspensión original y se coloca en un medio de cultivo adecuado para este tipo de crecimiento bacteriano, bajo un periodo de incubación según lo estimado, para posteriormente observar su crecimiento. Se registra la porción de la muestra que no presenta crecimiento la cual es identificada como P0 (x = 0). De acuerdo a ello, Poisson establece que: $P_0 = e^{-m}$ lo que lleva a calcular el valor de m mediante, $m = -\ln P_0$.

Cuantificación celular viables en placa: Es fundamental para contar las bacterias viables en un medio de cultivo sólido, el cual consiste en dividir la placa en cuadrantes y contar las colonias aisladas

Determinación de la proporción células viables/células totales: Este método implica monitorear regularmente el crecimiento de células de manera individual y establece la proporción de las células que se pueden visualizar en el microscopio, pero se les impide crecer, es decir que presentan inviabilidad. Esta técnica se lleva a cabo mediante micro cultivos en láminas portaobjetos

Recuento sobre filtros de nitrocelulosa: Para determinar la concentración bacteriana en suspensiones diluidas, se utiliza una técnica en la cual la suspensión atraviesa una membrana de nitrocelulosa en donde las bacterias son retenidas. Posteriormente, sobre un medio de cultivo sólido se coloca un filtro donde las bacterias desarrollan colonias,

contadas estas colonias y conociendo el volumen de la suspensión procesada se puede calcular la concentración inicial bacteriana en la muestra.

5.8. Ecuaciones matemáticas y modelos aplicados en el crecimiento microbiano

Arana et al. (s.f.) en su escrito plantea los criterios determinantes en la proliferación de microorganismos. Primeramente, la etapa de crecimiento de manera exponencial es la que se encarga de la proliferación propiamente dicha y, simplifican el proceso de ecuaciones matemáticas

$$dN/dt = \mu N$$

$$N = N_0 e^{\mu(t-t_0)}$$

Se define a través de la siguiente ecuación:

$$\ln N - \ln N_0 = \mu (t - t_0)$$

$$\log N - \log N_0 = \mu / 2,303 (t - t_0)$$

La constante μ representa la velocidad específica de crecimiento en horas en sentido opuesto o inversas (h^{-1}), siendo un indicador importante en el ritmo de crecimiento por unidad de biomasa. Otros parámetros incluyen los intervalos necesarios para que la población se duplique, es decir su tiempo de generación.

$$g = 0,693/\mu$$

La velocidad de crecimiento (K) cuyas unidades son generación por hora, es el tiempo de generación inversa

$$K = 1/g$$

Se establece el valor de μ_{\max} (velocidad máxima) de proliferación de una bacteria en un sustrato específico mediante la construcción de curvas de crecimiento con sustratos con diferentes concentraciones y cada una de ellas proporciona valores μ , que permiten determinar la máxima velocidad proliferante

$$\mu = \mu_{\max} S / (K_s + S)$$

La invariante de saturación del sustrato es representada como K_s , definida como la concentración a la cual corresponde a la mitad de μ_{\max} .

Además, se emplea la transformación de la ecuación de la siguiente manera:

$$1/\mu = 1/\mu_{\max} + (K_s/\mu_{\max}) (1/S)$$

La cosecha máxima y el rendimiento son parámetros claves que se dan en la fase estacionaria.

La biomasa máxima alcanzada se expresa con la ecuación siguiente:

$$M = M_t - M_0$$

$$M = M_t - M_0$$

Cosecha máxima: M_t representa la cantidad máxima alcanzada de biomasa, medida en el momento en donde el número de células es máximo en la fase estacionaria y esta se compara con la biomasa inicial M_0 expresada en gramos o miligramos

La biomasa en el tiempo t y es secuenciada y calculada en la fase estacionaria en el que el número celular es más alto y M_0 la biomasa del inóculo. El resultado se expresa en g, mm, etc.

Rendimiento: Es la relación de la biomasa que se produce con la que se consume y se determina bajo lo siguiente:

$$Y = \text{Biomasa producida} / \text{Sustrato consumido} = (M_t - M_0) / (S_0 - S_t)$$

S_0 representa la cantidad inicial de sustrato y S_t la cantidad en el momento (t) cuando se obtienen un número máximo de células y se expresa como g de células/g de sustrato consumido.

UNIDAD 4. DIVERSIDAD DE PROCESOS METABÓLICOS

6. Diversidad en los procesos metabólicos a nivel microbiano

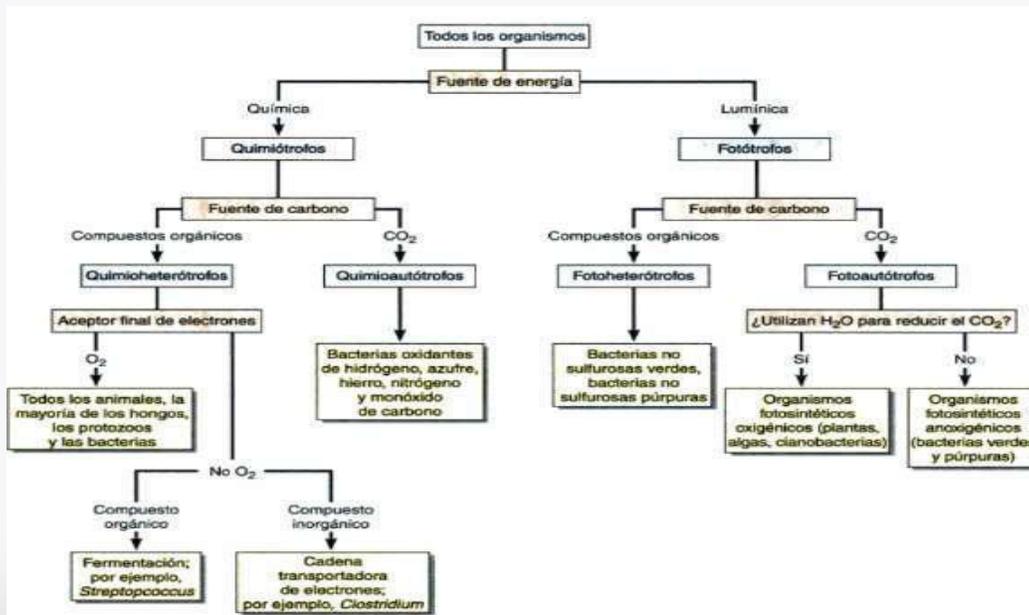
Según lo afirmado Tortora *et al.*, (2009), todos los organismos se clasifican a través de su fuente de carbono o energía (p.145), dejando al descubierto sus intereses nutricionales. La diversidad metabólica de los microorganismos es amplia, y algunos de ellos son capaces de metabolizar sustancias inorgánicas mediante rutas exclusivas que no están presentes en plantas o animales.

Estos a su vez, se clasifican según en quienes utilizan la luz como fuente principal de energía, llamados fotótrofos y los que dependen de reacciones químicas como fuente de energía mediante compuestos orgánicos e inorgánicos, llamados quimiótrofos. Además, según su fuente de carbono se clasifican en autótrofos o heterótrofos que usan CO₂ y heterótrofos o organotrofos que requieren del carbono orgánico

La figura 22 determina las combinaciones de estas fuentes de energía y carbono, clasificándolos en químicas y lumínicas:

Figura 22

Clasificación de los organismos según el tipo de nutrición



Fuente: Tortora *et al.*, 2009, p144.

6.1. Principios de fototrofia

La fototrofia es la utilización de la energía luminosa, que está muy expandida en el mundo de los microorganismos. Es necesario comprender las propiedades y formas de fijación de energía de los microorganismos fototróficos; estos utilizan el dióxido de carbono como única fuente de carbono y coexisten, asegurando su especie (Madigan, 2015; p404)

6.1.1 Fotosíntesis y clorofilas

La transformación de la luz solar a energía química, identificada como fotosíntesis, es una de las etapas más importantes de la Tierra. Los organismos que emplean este proceso pueden utilizar el CO₂ como única fuente de carbono, identificados como fotótrofos (encargados de la fotosíntesis), y autótrofos. Durante la fotoautotrofia se utiliza la energía luminosa para transformar CO₂ en compuestos orgánicos y en la fotoheterótrofia, la fuente de carbono usada por los fotótrofos son los compuestos orgánicos.

Para que ocurra la fotosíntesis se necesitan pigmentos que reaccionan a la luz, los más importantes son los encontrados en algas, *cianobacterias* y plantas, conocidas como clorofila y las que se hallan en bacterias verdes y rojas, identificadas como bacterioclorofila. Las *cianobacterias* y las bacterias rojas-verdes esta catalogadas como fototróficas. El proceso de transformación de energía fotosintética comienza con la absorción de energía luminosa por la clorofila y la bacterioclorofila, y finalmente genera energía química como modelo de ATP.

Dos procesos fundamentales operan simultáneamente en la fototrofia:

1. Generación de energía universal de las células, ATP
2. El CO₂ es reducido para formar material celular requerido

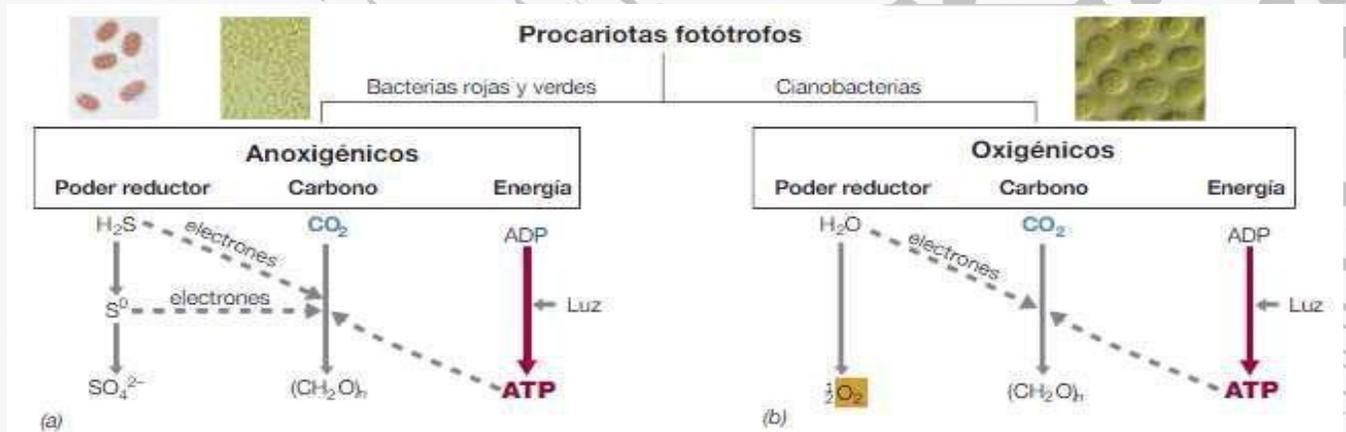
Para mantener el crecimiento autótrofo, la energía necesaria proviene del Trifosfato de adenosina, mientras que los electrones requeridos para la reducción del dióxido de carbono se obtienen del NADH o NADPH, los cuales se forman cuando el NAD (P) se reduce

mediante donadores de electrones del entorno. Los electrones son aportados como compuestos de azufre reducidos como el H_2S o H_2 en el caso de bacterias verdes y rojas; en cambio las plantas y cianobacterias, obtienen sus electrones del H_2O

Durante la fotosíntesis oxigénica de las cianobacterias, la oxidación del agua produce O_2 como subproducto, por tanto, este proceso se denomina fotosíntesis oxigénica y las bacterias que no generan oxígeno como producto importante se denominan anoxigénicas, entre ellas las bacterias rojas y verdes, como se observa en la figura 23. El oxígeno generado por las cianobacterias durante decenas de millones de años transformó el planeta anóxico, que era la tierra, en un planeta con características óxicas, esto fue preparado con el fin de generar una diversidad de microorganismos eucariotas que luego se convirtió en animales y plantas. En la figura 23 se puede visualizar que los que tienen oxígeno y son fotótrofos producen este gas (O_2), en tanto los anoxicos no producen.

Figura 23

Patrones de fotosíntesis. Producción de energía y agentes reductores en fotótrofos (a) anoxigénicos y (b) oxigénicos.



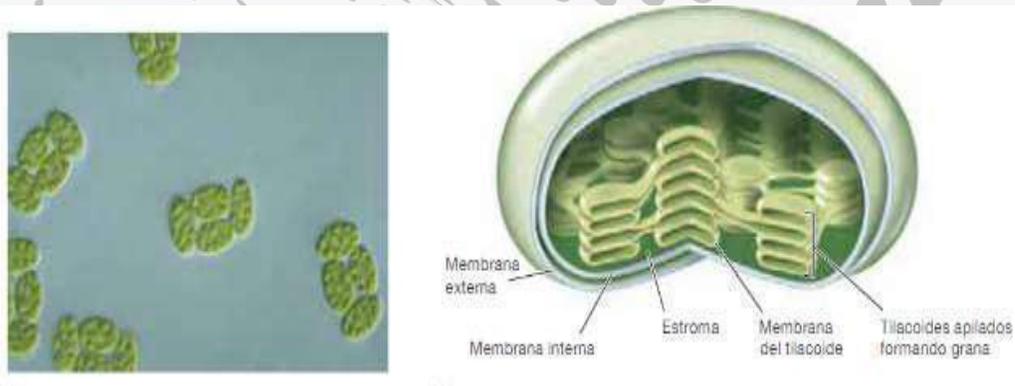
Fuente: Madigan, 2015; p405.

6.1.1.1. Captación de luz mediante pigmentos fotosintéticos

6.1.1.1.1. Relación estructural de membranas fotosintéticas, cloroplastos y cromosomas

Dentro de los sistemas de las membranas celulares se hallan los pigmentos clorofílicos y otros componentes del sistema de captación lumínica. El sitio específico de la membrana fotosintética es distinto en los procariotas y en los eucariotas, en los últimos la fotosíntesis se produce en los orgánulos que están adentro de las células, los cloroplastos; en la figura 24 se puede ver la conformación de esta mediante un sistema de laminación. Estos sistemas fotosintéticos que están adheridos a la membrana se llaman tilacoides y se implementan en forma de grana. Los tilacoides están distribuidos en forma que el espacio que contiene el cloroplasto se divide en dos partes, el estroma, que es el espacio que se encuentra alrededor de los tilacoides, y el espacio inferior, que está adentro de la formación de los tilacoides. Esta disposición ofrece la posibilidad de generar una nueva corriente de protones propulsada por luz, la cual es utilizada para la elaboración de ATP.

Figura 24
Cloroplastos



Fuente: Madigan, 2015; p407

Los microorganismos fotótrofos que no tienen cloroplastos en las bacterias rojas carecen de pigmentos que se toman en consideración dentro de sistemas de membranas que se originan por la invaginación de la capa citoplasmática.

En bacterias de rojas tienen disposiciones vesiculares denominadas cromatóforos, o bien tienen disposición de membrana que se amplifica, conformando así las lámelas que no son de origen bacteriano, estas lámelas se llaman tilacoides debido a su semejanza con los tilacoides de los cloroplastos de las algas. El más eficaz instrumento para capturar la luz de baja magnitud es el clorosoma. En las bacterias anoxicas verdes que no contienen Azufre y en las que sí lo contienen, el cloroplasma se hace notar como la más eficaz estructura para capturar luz de baja intensidad y opera como un sistema de antena amplio en el cual las moléculas de bacterioclorofila no están atadas a proteínas, en contraste con las cianobacterias y las bacterias rojas.

6.1.1.1.2. funcionalidad de los Carotenoides

Los carotenoides son los tonos complementarios más frecuentes en los fotosintetizadores, que se integra en la capa fotosintética de manera firme. En la figura 25 se puede ver la disposición de un carotenoide clásico de β -caroteno, resaltando sus vínculos de dos vías paralelas. Estos pigmentos acostumbran a ser verdes, rojo, marrón, amarillo, y toman la luz en el ámbito azul del espectro, de modo que se puede ver en la figura 26 como se muestra la esencia principal de los fotótrofos anoxigénicos, como por ejemplo en la forma en que enmascaran el color de las bacterioclorofilas, los carotenoides son los responsables de los

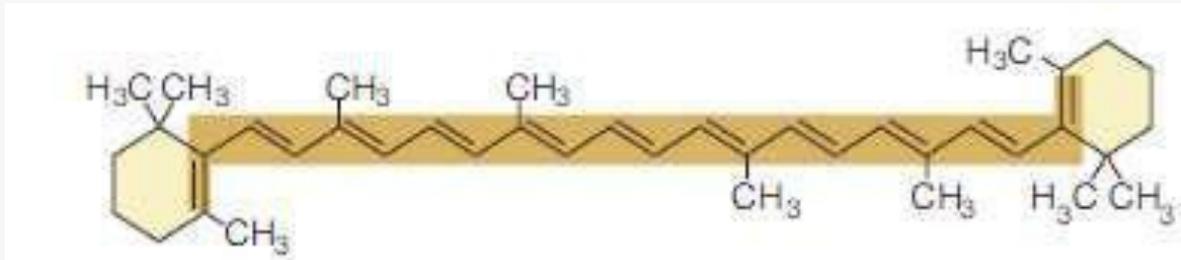
tonos resplandecientes, rojo, verde, rosa, morado, o marrón, que se pueden ver en diferentes especies de fotótrofos anoxigènes. Los carotenos están compuestos por hidrocarburo de caroteno y las xantofilas por oxígeno.

En las mezclas que tienen la capacidad de fotosintetizar, los carotenoides están atados a la clorofila o a la bacterioclorofila, y es parte de la energía que se recibe se trasmite al centro de la reacción; sin embargo,

los fotótrofos deben gestionar la luz brillante, que puede perjudicar de laguna manera a las células al inducir reacciones de fotooxidación y a su vez pueden ocasionar modelos tóxicos de oxígeno, como el singulete de oxígeno y el superóxido. Los carotenoides juegan un papel relevante en la fotoprotección al absorber en una mayoría a la luz dañina, minimizando así los riesgos de fotooxidación peligrosa.

Figura 25

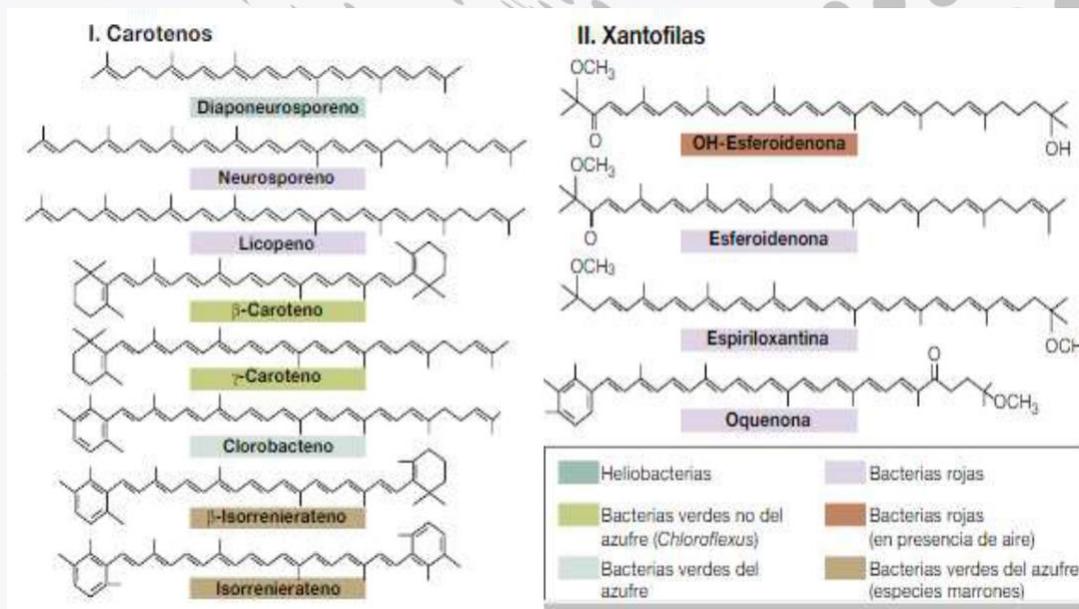
carotenoide común β -caroteno a nivel estructural



Fuente: Madigan, 2015; p408.

Figura 26

Carotenoides comunes a nivel estructural hallados en fotótrofos anoxigénicos.



Fuente: Madigan, 2015; p409.

6.1.1.1.3. Rol de las Ficobiliproteínas y ficobilisoma como captadores de luz

Los pigmentos conocidos como ficobiliproteínas, principales sistemas que permite que la luz sea captada en las cianobacterias y cloroplastos de algas rojas, están constituidos por tetrapirroles azul verdoso o rojos que se encuentran en una misma línea, conocidos como bilinas. Estas ficobilinas establecen un enlace con proteínas brindando el color que caracteriza a algunas algas y *cianobacterias*.

6.1.1.2. Procesos fotosintéticos anoxigénicos

Durante las reacciones luminosas de fotosíntesis, los electrones se desplazan a través de una cadena de transporte en la membrana fotosintética, moviéndose desde los componentes con un potencial reductor (E0) más electronegativo hacia aquellos con potencial más electropositivos. En movimiento de electrones genera un gradiente de protones, que impulsa

la síntesis de trifosfato de adenosina. Los elementos clave en esta fase son los centros de reacción y membranas fotosintética.

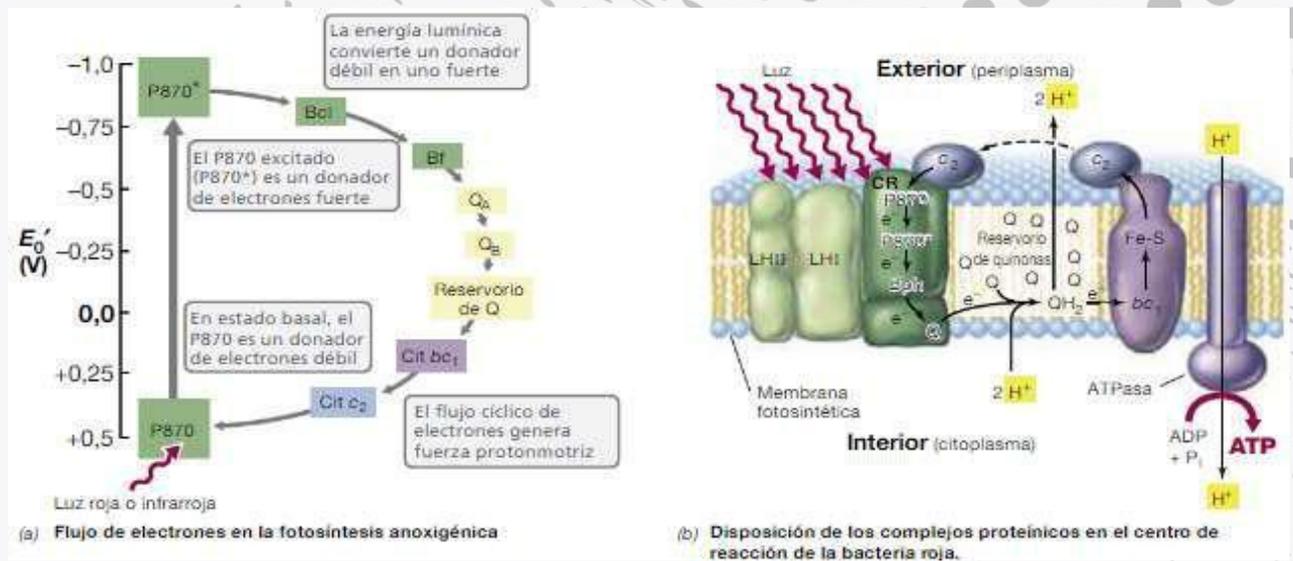
En las bacterias rojas, los centros de reacción están compuestos por tres polipéptidos denominados L, H y M. Estos polipéptidos, junto con una molécula de citocromo c, están firmemente integrados en la membrana fotosintética, atravesándola en múltiples ocasiones. Los polipéptidos L, H y M juntan dos moléculas de *a*-bacterioclorofila, que son esenciales para el flujo de electrones durante la fotosíntesis. Además, incluyen dos moléculas de bacteriofeofitina (*a*-bacterioclorofila sin el átomo de magnesio), dos moléculas de quinona y un caroteno.

Los componentes del centro de reacción se encuentran dispuestos de forma que facilitan la interacción durante las reacciones de transferencia de electrones, que ocurren con gran rapidez en las etapas iniciales de la conversión de energía fotosintética. Esta disposición permite una eficiente captura y transferencia de electrones, esencial para el proceso fotosintético.

Transporte de electrones por las bacterias rojas: Cuando la energía proveniente de la luz se absorbe por los sistemas antena y se transfiere de forma igualitaria al par de bacterioclorofila a, proveniente de sus moléculas, se da el inicio de las reacciones luminosas de la fotosíntesis. La luz permite la excitación del par transformándolo a un donador de electrones fuerte, con este donador los pasos restantes del flujo fotosintético se asemejan a los observados de respiración. Como se ilustra en la figura 27, se genera una fuerza protón motriz, debido a que el flujo de electrones en las bacterias rojas ocurre a través de la membrana fotosintética, moviéndose desde los portadores con un potencial de reducción bajo hacia aquellos con potencial más alto, lo que permite la conversión de energía lumínica a química

Figura 27

Flujo de electrones en la fotosíntesis anoxigénica de bacterias rojas, bacterias verdes del azufre y heliobacterias.



Fuente: Madigan, 2015, p.412).

6.1.1.3. Proceso fotosintético oxigénico

A diferencia del flujo de electrones en los fotótrofos anoxigénicos y oxigénicos, los electrones se desplazan mediante dos sistemas fotosintéticos distintos, denominados Fotosistema I (PSI) y Fotosistema II (PSII). Los fotocomplejos embebidos ubicados en las membranas, en donde se lleva a cabo las reacciones anoxigénicas fotosintéticas, se localizan según el tipo de célula; apilados en el citoplasma se encuentran las cianobacterias y los cloroplastos se sitúan en las células eucariotas.

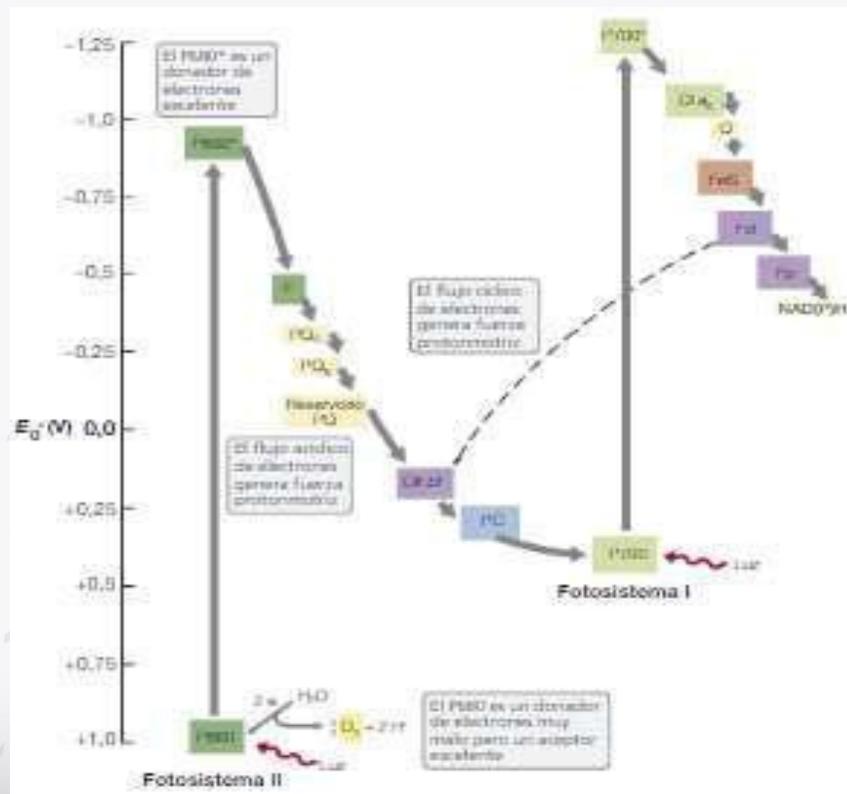
Mecanismo de flujo de electrones y producción de ATP en la fotosíntesis oxigénica: En la fotosíntesis oxigénica, los fotosistemas I y II colaboran en un proceso conocido como esquema Z, denominado así porque la trayectoria de los electrones sigue una forma similar a una Z inclinada, como se muestra en la Figura 28. En este proceso de fotosistema II tiene un potencial de reducción en sus moléculas de clorofila P680 que es superior al del par O_2/H_2O , es decir, es más electropositivo. Esta característica se requiere para iniciar la primera fase del

flujo de electrones, que implica la división del agua en oxígeno y electrones.

La energía lumínica tiene la capacidad de transformar el P680 en un reductor fuerte que permite la reducción de clorofilas *a* carentes de átomo de Mg, llamada feofitina, con un potencial de reducción que se acerca a $-0,5$ V. Seguido, el H_2O tiene la tarea de donar un electrón a la molécula que se encuentra oxidada de P680, lo que permite que su reducción basal regrese; el electrón pasa por medio de varios transportadores membranales desde la feofitina, manteniendo un potencial reducido cada vez más positivo las cuales se identifican como citocromos, quinonas y plastocianina. El electrón de reacción PSI, es donado por las plastocianinas. El electrón que con anticipación absorbió la energía lumínica y ha donado un electrón, recibe una aceptación proveniente del electrón del PSI, específicamente P700, eventualmente, contribuye a que se lleve a cabo la reducción de $NADP^+$. Los electrones avanzan mediante un gran número de intermediarios de PSI y finaliza cuando se establece $NADP^+$ a $NADPH$.

Figura 28

Esquema Z de la fluidez de electrones llevada a cabo en un proceso fotosintético oxigénico



Fuente: Madigan, 2015; p413

6.2. Mecanismos para la fijación del dióxido de carbono

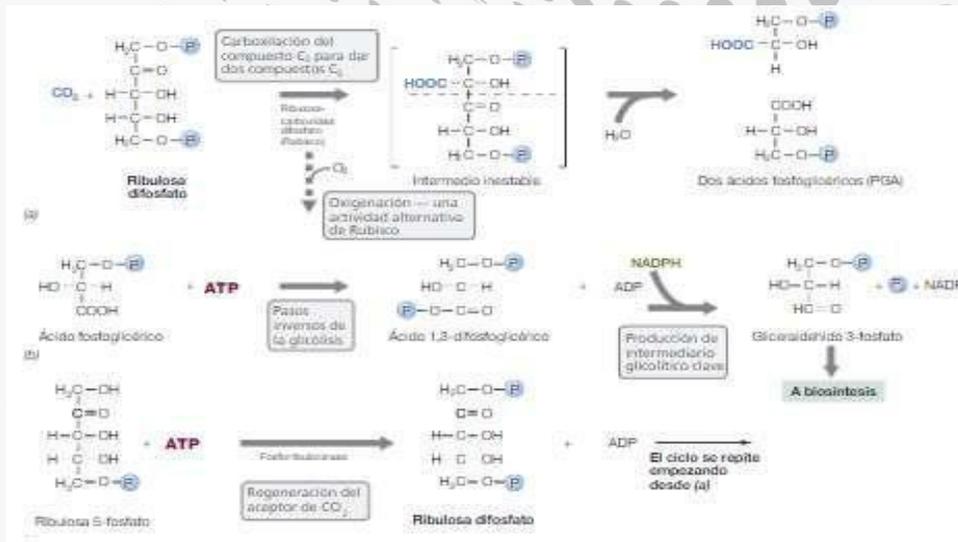
Mandigan (2015) sostiene que el proceso autotrófico consiste en la reducción y asimilación del dióxido de carbono (CO_2), una forma de carbono con baja energía y alta oxidación, para convertirlo en material celular. Este proceso es característico de muchos microorganismos, incluyendo casi todos los fotótrofos y quimiolitótrofos (p. 414).

6.2.1. Mecanismos del ciclo de Calvin en la fotosíntesis

Existen diversas rutas autótrofas, sin embargo, el ciclo de Calvin tiene mayor prevalencia en ambientes naturales. La mayoría de bacterias quimiolitótrofas, bacterias rojas, algas, entre otras, es donde en su mayoría se encuentra presente y se lleva a cabo este ciclo, el cual requiere de CO_2 y una molécula aceptora de este junto con NAD (P) H, ATP y fosforribulocinasa y la ribulosa-carboxilasa difosfato, identificada como dos enzimas necesarias para llevar a cabo estos pasos.

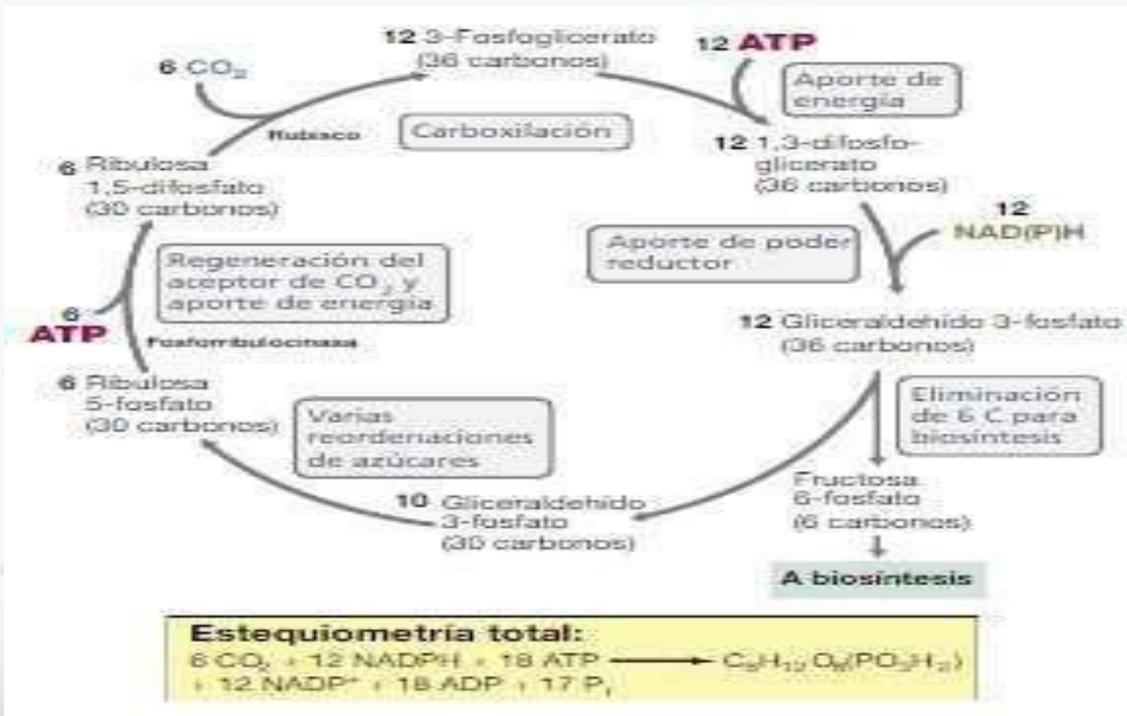
La rubisco o ribulosa-carboxilasa difosfato, cataliza el paso inicial del ciclo, esta enzima es la encargada de que se formen mediante catalización 2 moléculas de ácido 3- fosfoglicérido mediante el CO_2 y la ribulosa difosfato, ilustrada en la figura 29. El ciclo de Calvin llega a usar hasta 6 moléculas de dióxido de carbono para poder llevar a cabo la síntesis de una molécula de hexosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Se necesitan 6 moléculas de ribulosa difosfato (30 carbonos) para que sean incorporadas 6 moléculas de CO_2 , posteriormente se generan 36 átomos de carbono que corresponden a 12 moléculas de PGA mediante la carboxilación de las anteriores, como se muestra en la figura 30. En la etapa que culmina este ciclo, la enzima fosforribulocinasa es la requerida para regenerar las 6 moléculas de aceptor, ribulosa-1,5-bisfosfato, el aceptor de CO_2 . Para la síntesis de una molécula de glucosa a partir de 6 moléculas de CO_2 , se requieren 12 NADPH y 18 ATP.

Figura 29
Procesos requeridos en el ciclo de Calvin



Fuente: Madigan, 2015; p415

Figura 30
Ciclo de Calvin- elaboración de una molécula de hexosa a partir de dióxido de carbono



Fuente: Madigan, 2015; p415).

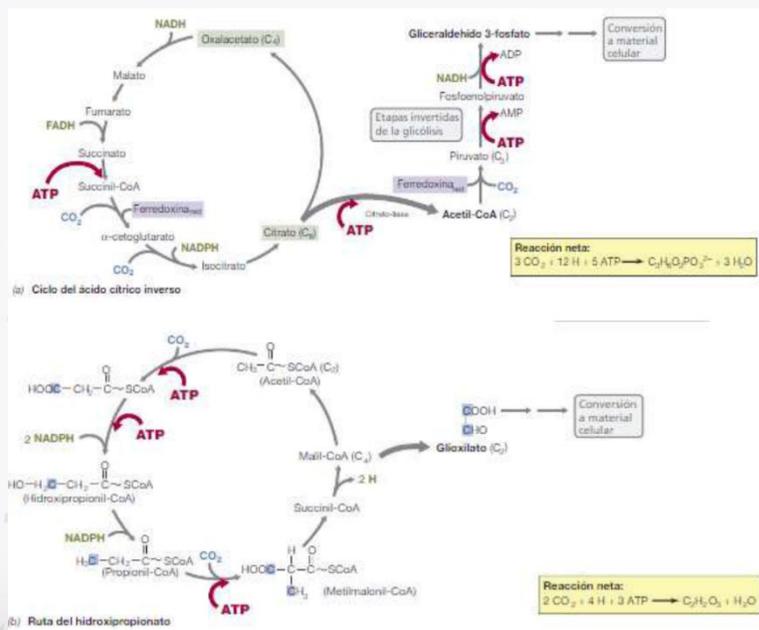
6.2.2. Bacterias verdes y su mecanismo de Autotrofia

A pesar de su naturaleza autótrofa, el ciclo de Calvin no es funcional para el caso de las bacterias verdes del azufre; en lugar de eso, estos microorganismos emplean dos rutas distintas a nivel autótrofo.

Las bacterias verdes del azufre como por ejemplo *Chlorobium* utilizan una ruta alternativa conocida como el ciclo del ácido cítrico inverso para formar dióxido de carbono; este ciclo se estipula en base a la fase del ácido cítrico inverso para fijar el dióxido de carbono, como se ilustra en la figura 31. Este proceso se lleva a cabo gracias a la actividad combinada de la ferredoxina y dos enzimas especializadas que facilitan la reducción del CO₂; la ferredoxina, que se produce durante las reacciones luminosas en estas bacterias, actúa como un donador de electrones con un potencial de reducción muy negativo. Las reacciones catalizadas por enzimas unidas a la ferredoxina incluyen la carboxilación de acetil-CoA a piruvato y la carboxilación de succinil-CoA a α-cetoglutarato. Estas enzimas funcionan en sentido opuesto al ciclo oxidativo convencional y catalizan varias reacciones del ciclo de Krebs inverso.

Figura 31

Vías autótrofas especializadas de bacterias verdes fotótrofas



Fuente: Madigan, 2015; p416).

6.3. Quimiolitótrofa

La quimiolitótrofa probablemente representó la forma más antigua de fijación de energía del planeta, dado que se encuentra ampliamente distribuida entre linajes cercanos a la base de los árboles filogenéticos incluyendo a Bacteria y Archaea. Se denominan quimiolitótrofos a los organismos que adquieren su energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos y la mayoría de las bacterias con esta denominación, son autótrofas; estos organismos requieren de ATP y poder reductor para desarrollarse con una única fuente de carbono, CO₂, tal como ocurre con los fotótrofos. Algunos organismos obtienen su energía a través de la oxidación de compuestos inorgánicos, pero requieren una fuente de carbono de compuestos orgánicos, estos organismos se denominan mixótrofos.

6.3.1. Proceso oxidativo de hidrogeno (H₂)

El hidrogeno (H₂) es un subproducto común del metabolismo de los microorganismos, particularmente en ciertos procesos de fermentación y las quimiolitótrofas aerobias, conocidas también como bacterias hidrogeno o hidrogenasa, cuentan con la capacidad para utilizar el hidrógeno como donante de electrones para su metabolismo energético. Del mismo modo, existen numerosas bacterias y arqueas anaeróbica que oxidan H se distinguen por utilizar diversos aceptores de electrones como CO₂, sulfatos y nitratos



6.3.1.1. Energía derivada del proceso oxidativo del hidrógeno

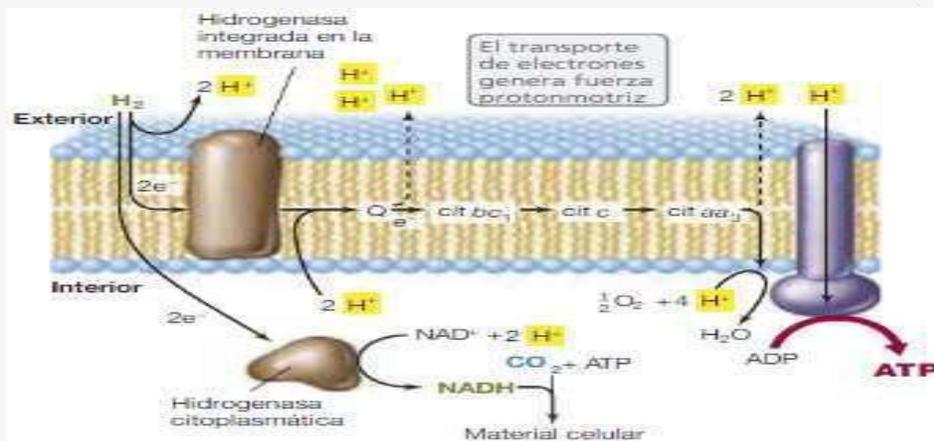
La síntesis de ATP en el periodo oxidativo del hidrógeno con oxígeno se produce a través de las reacciones de la cadena de transporte de electrones quien es el responsable de un gradiente conocido como una fuerza protón motriz que impulsa la síntesis de ATP. La enzima hidrogenasa cataliza una reacción altamente exergónica que tienen la capacidad de acoplar con la síntesis del adenosín trifosfato, en donde primeramente se transfieren a una quinona aceptora los electrones de hidrógeno. Como se ilustra en la figura 32, los electrones se

trasladan dando lugar a una fuerza protón motriz que reduce el oxígeno a agua, este proceso se da a través de una serie de citocromos.

Desde ese punto, los electrones se desplazan a través de un grupo de citocromos lo que resulta en la generación de una fuerza protón motriz hasta llegar a la reducción del oxígeno a agua, como ejemplifica en la figura 32. En algunas bacterias hidrogenadas, se sintetizan un número de dos tipos de hidrogenasas, una citoplasmática y una que se integra a nivel membranar. La hidrogenasa de membrana está involucrada en la producción de energía, mientras que la hidrogenasa citoplasmática no cumple con el mismo rol. En lugar de utilizar el hidrógeno como donador de electrones para el metabolismo de energía, esta hidrogenasa cataliza la reducción de NAD^+ a NADH .

Figura 32

Bioenergética y funciones de las enzimas hidrogenasas de bacterias aerobias de hidrógeno



Fuente: Madigan, 2015

6.3.2. Dinámica de oxidación de compuestos del azufre reducidos

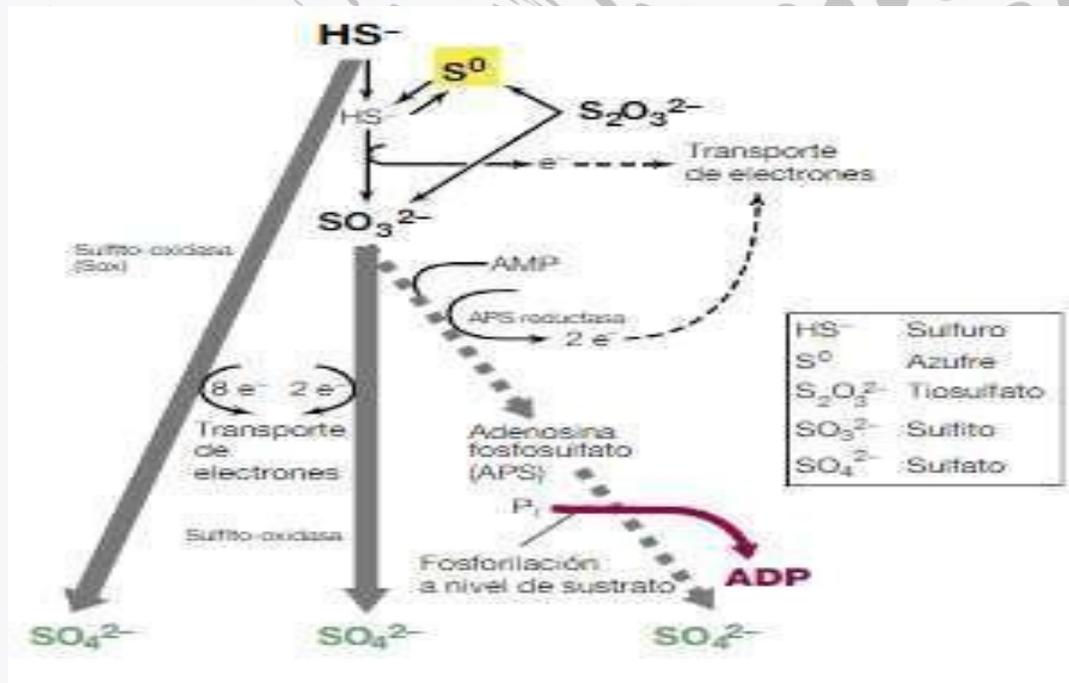
Las bacterias del azufre incoloras, llamadas de esta manera para diferenciarlas de las bacterias del azufre que son rojas, con pigmentos tienen la capacidad de utilizar variedad de compuestos del azufre reducido, como donantes de electrones. La definición de quimiolitotrofia se originó a partir de los estudios microbiológicos realizados por el ruso de apellido Winogradsky en las bacterias del azufre. La quimiolitotrofia representa un estilo vital metabólico que se requiere en un gran número de bacterias.

6.3.2.1. Energética derivada del proceso oxidativo del azufre.

Los compuestos de azufre comúnmente empleados como donadores de electrones incluyen H_2S , S_2O_3 , SO_3^{2-} y S_0 . El sulfato (SO_4^{2-}) suele ser el producto final de la oxidación del sulfuro: la oxidación del sulfuro se realiza en etapas sucesivas, comenzando con la formación de azufre elemental (S_0). Bacterias como *Beggiatoa* llevan a cabo la oxidación del sulfuro y almacenan el azufre elemental en su interior, como se muestra en la Figura 33. Este azufre elemental actúa como una reserva de energía, que puede ser utilizada más tarde cuando se agota el sulfuro, al ser oxidado a sulfato. Dado que el azufre elemental es poco soluble, las bacterias deben adherirse a las partículas de azufre para procesarlas. La oxidación de los compuestos de azufre produce protones, lo que acidifica el entorno circundante, debido a esta acidificación, muchas bacterias han desarrollado mecanismos para tolerar ambientes ácidos, y algunas son incluso acidófilas. Un ejemplo notable es *Acidithiobacillus thiooxidans*, que prospera mejor en condiciones de pH entre 2 y 3.

Figura 33

Procesos oxidativos de compuestos de azufre reducidos en quimiolitotrófos del azufre.



Fuente: Madigan, 2015.

6.3.3. Proceso oxidativo del hierro (Fe^{2+})

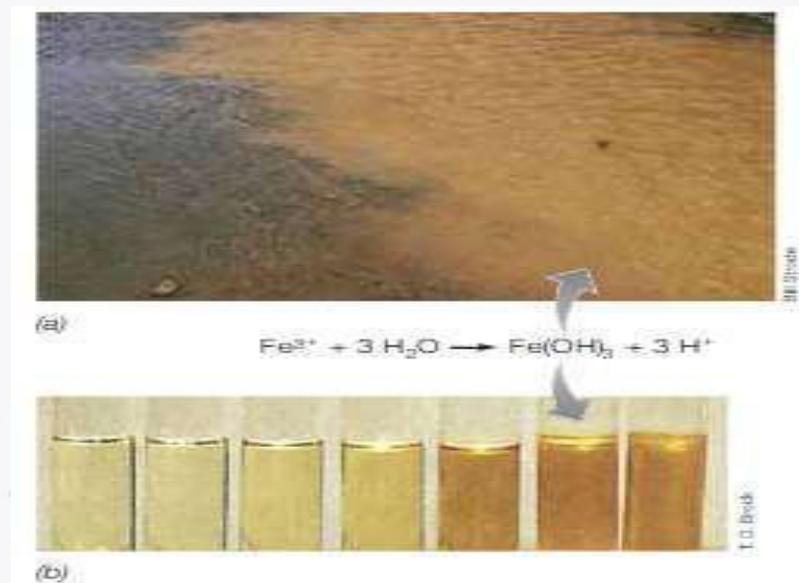
La oxidación del hierro ferroso (Fe^{2+}) a hierro férrico (Fe^{3+}) en presencia de oxígeno es un proceso requerido para las bacterias quimiolitótrofas del hierro. Sin embargo, bajo condiciones de pH ácido, este proceso genera solo una cantidad limitada de energía. Debido a esto, las bacterias deben realizar la oxidación de grandes volúmenes de hierro para poder sintetizar una cantidad mínima de biomasa. En ambientes acuáticos, el hierro férrico recién formado tiende a precipitarse como hidróxido férrico insoluble y otros compuestos, lo que a su vez contribuye a la acidificación del entorno.

6.3.3.1. Bacterias con la capacidad de oxidar hierro

Acidithiobacillus ferrooxidans y *Leptospirillum ferrooxidans*, son las bacterias de Fe mejor conocidas, con la capacidad de proliferar de forma autotrófica usando el hierro ferroso (Fe^{2+}), como se muestra en la Figura 34, actúa como donador de electrones en el proceso de oxidación; a un pH de 1, la energía generada es limitada, y el crecimiento óptimo de las bacterias quimiolitótrofas del hierro se produce en un rango de pH entre 2 y 3. Estas bacterias suelen encontrarse en ambientes ácidos, como las zonas acuáticas de las minas de carbón, donde la contaminación ácida es prevalente.

Figura 34

*Bacterias que oxidan el hierro. (a) drenaje ácido de una mina, se observa el punto de unión de un río normal y un arroyo que drena una zona minera de carbón (b) cultivos de *A. ferrooxidans**



Fuente: Madigan, 2015.

En un entorno de pH neutro, el hierro ferroso (Fe^{2+}) se oxida de manera natural a hierro férrico (Fe^{3+}), un proceso que limita las áreas donde las bacterias oxidantes de hierro pueden prosperar. Estas bacterias son principalmente activas en lugares donde el Fe^{2+} se encuentra en condiciones anóxicas, es decir, en ausencia de oxígeno. Por ejemplo, en acuíferos

anóxicos, el Fe^{2+} se libera y se encuentra en su estado reducido. Cuando estos acuíferos con Fe^{2+} se conectan a manantiales con agua rica en oxígeno, como ocurre en los manantiales ferruginosos, el Fe^{2+} entra en contacto con el oxígeno. Las bacterias oxidantes de hierro aprovechan esta exposición para transformar Fe^{2+} en Fe^{3+} antes de que ocurra la oxidación espontánea del hierro.

6.4. Modelos de Fermentación

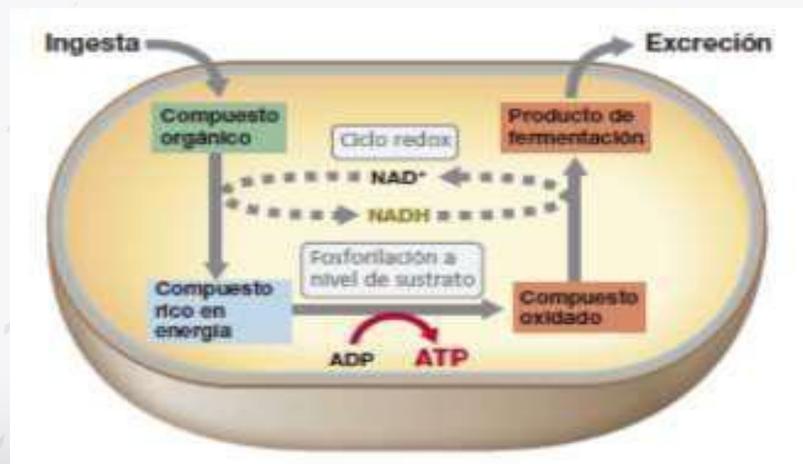
En los temas a continuación, Madigan (2015) aborda diversos tipos de fermentación, incluyendo la fermentación en general, la fermentación ácido-mixta, la fermentación ácido-láctica, la fermentación de mixta de ácidos, aminoácidos y la fermentación sin fosforilación a nivel de sustrato.

6.4.1. Aspectos energéticos y equilibrio redox

En ciertos entornos microbianos sin oxígeno, conocidos como anóxicos, la descomposición de materia orgánica ocurre de manera anaeróbica. Cuando no están presentes aceptores de electrones como sulfato, nitrato, o hierro férrico, la descomposición de compuestos orgánicos se lleva a cabo mediante fermentación, como se muestra en la Figura 35.

Figura 35

Elementos fundamentales en procesos fermentativos



Fuente: Madigan, (2015).

6.4.1.1. Fosforilación a nivel de sustrato y compuestos ricos en energía.

La energía puede ser generada a través de la fosforilación a nivel de sustrato utilizando una variedad de compuestos. Para comprender este proceso, se deben conocer los compuestos ricos en energía, estos compuestos orgánicos, que incluyen una molécula de coenzima A y también un enlace fosfato de alta energía, poseen enlaces que son energéticamente ricos debido a la alta energía liberada durante su hidrólisis, la cual es extremadamente exergónica.

6.4.2. Clasificación de las fermentaciones

Las fermentaciones se pueden clasificar en dos grandes categorías: según los productos resultantes o según los sustratos fermentados. Entre las fermentaciones más destacadas basadas en los productos obtenidos se encuentran la fermentación alcohólica, ácido láctico, propiónico, mixtos, butírico y acetogénica.

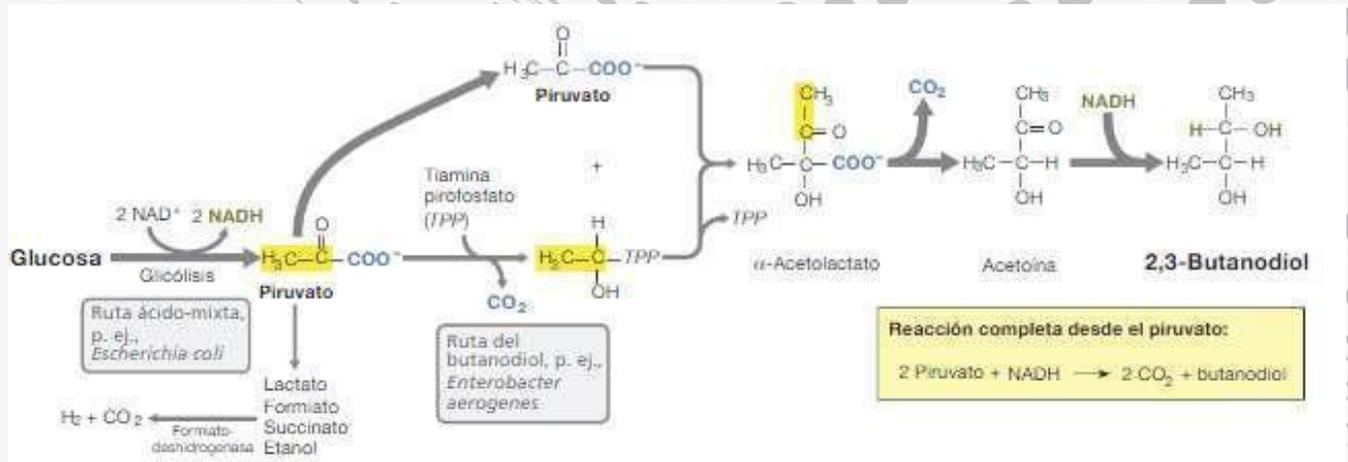
Por otro lado, algunas fermentaciones se clasifican en función del sustrato que es fermentado en lugar del producto final. Ejemplos de estas incluyen las fermentaciones de aminoácidos, pirimidinas, purinas, y succinato/oxalato. Además, ciertos microorganismos anaerobios pueden fermentar compuestos aromáticos y otros sustratos poco comunes. En algunos casos, únicamente un grupo específico de anaerobios puede llevar a cabo ciertas fermentaciones, mostrando una especialización en la capacidad para metabolizar sustratos que otros no pueden. Esto los convierte en especialistas en procesos metabólicos particulares.

6.4.2.1. Fermentación ácido-láctica

Esta fermentación se da mediante bacterias ácido-lácticas además de ser bacterias Gram positivas que no fermentan endosporas que generan ácido láctico como resultante de la fermentación de azúcares. Existen dos tipos de fermentación, una que forma lactato junto con otros productos, principalmente etanol y dióxido de carbono, conocida como hetero fermentativa, y otra que produce solo el ácido láctico llamada homo fermentativa. La Figura 36 ilustra los diferentes caminos de fermentación de glucosa en bacterias ácido-lácticas, distinguiendo entre las homofermentadoras y heterofermentadoras. Las variaciones en los

Figura 37

Fermentaciones ácido- mixtas en producto de butanodiol



Fuente: Madigan, 2015; p429.

6.4.2.3. Fermentación de aminoácidos

Los clostridios proteolíticos, como ciertas especies del género *Clostridium*, realizan la fermentación de aminoácidos. Estos microorganismos degradan las proteínas a través de la descomposición de tejidos muertos, liberando productos de fermentación específicos. Algunas especies, como el patógeno *Clostridium tetani*, que causa el tétanos, son estrictamente proteolíticas, es decir, se especializan únicamente en la degradación de proteínas. En contraste, otras especies de *Clostridium* poseen tanto capacidades proteolíticas como sacarolíticas, permitiéndoles descomponer tantas proteínas como carbohidratos. En función de las especies, algunos microorganismos fermentan aminoácidos de manera individual como serina, histidina, cisteína, treonina o alanina; teniendo en cuenta que los procesos bioquímicos en este tipo de fermentaciones no son sencillos, se lleva a cabo una estrategia metabólica relativamente simple. En la mayoría de los casos los aminoácidos son utilizados para llegar finalmente a la producción de un acil-CoA proveniente de ácido graso, como butirilo, acetilo, o caproilo, generando ATP a través de la fosforilación por niveles de sustrato. Además, la fermentación de aminoácidos típicamente produce amoníaco y CO_2 como productos finales. En algunas especies sólo fermenta un par de aminoácidos, en estos casos un aminoácido actúa como donador de electrones y pasa a ser oxidado, mientras que el

otro se reduce porque actúa como aceptor de electrones. Este Proceso fermentativo colaborativo aminoacídico se denomina reacción de stickland, otorgado por su descubridor. Dentro de los ejemplos se destaca quien fermenta alanina quien tiene la tarea de ser donador de electrones y glicina quien es el aceptor, esto ocurre en el caso de *Clostridium sporogenes*, como se ilustra en la figura 38.

Figura 38
Reacción stickland

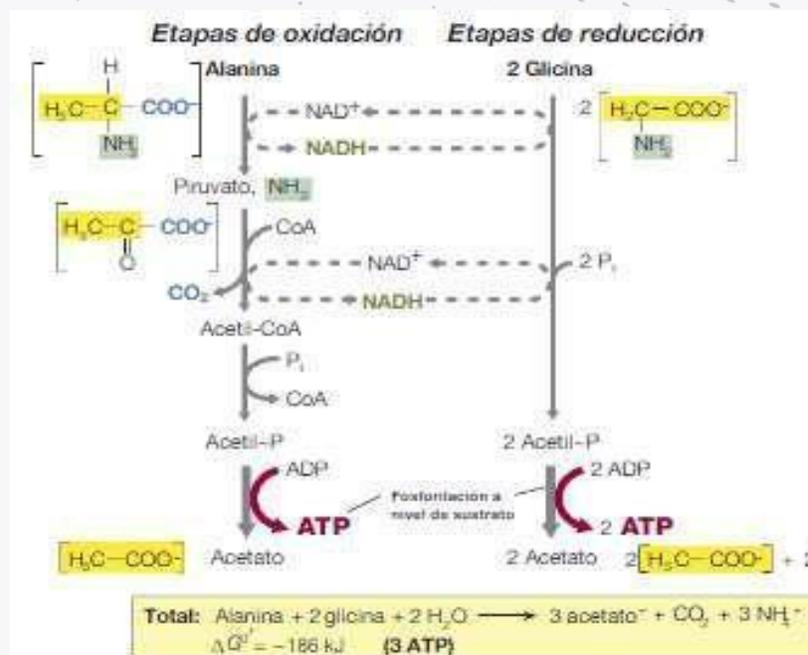


Figura: Madigan, 2015; p431

6.4.2.4. Fermentación alcohólica

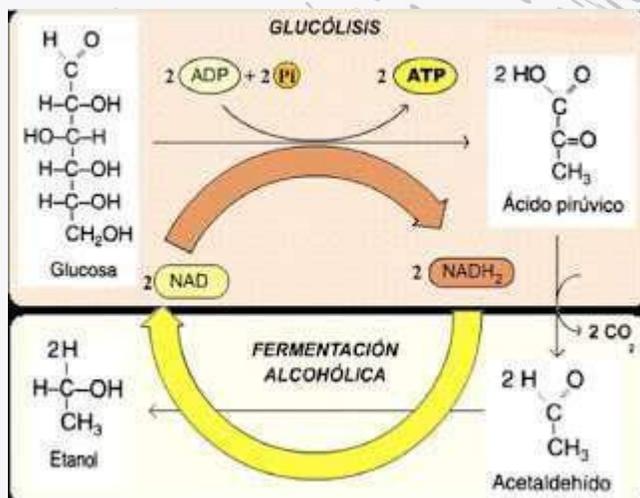
Méndez (2011) describe la fermentación alcohólica como un proceso biológico en el que los azúcares, como la glucosa, se convierten en alcohol etílico y CO_2 . Este proceso es llevado a cabo por ciertas levaduras y bacterias; las levaduras por su parte se convierten los azúcares en subproductos en condiciones anaeróbicas, es decir que no necesitan oxígeno y las bacterias no son tan comunes para llevar a cabo procesos fermentativos, sin embargo, también operan

en ausencia de oxígeno o en condiciones microaerófilos, pero producen otros compuestos durante este proceso, como ácido acético y láctico. Esto da lugar a un alcohol en forma de etanol, CO_2 (gas) y ATP, moléculas que emplean la familia de microorganismos fermentativos en sus metabolismos energéticos como se muestra en la figura 39. Diversos hongos, algas, bacterias, y algunos protozoos realizan la fermentación de azúcares para producir etanol y dióxido de carbono, un proceso conocido como fermentación alcohólica. En estas fermentaciones, el piruvato, derivado del ácido pirúvico, sufre una descarboxilación para formar acetaldehído. Este acetaldehído es luego reducido a etanol por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, utilizando NADH como donador de electrones.

Desde la perspectiva humana, la fermentación alcohólica es un proceso bioquímico cuyo objetivo principal es la producción de etanol, para ello intervienen algunos microorganismos; resaltando como protagonistas a las levaduras, quienes, mediante la ausencia de oxígeno, es decir un ambiente aeróbico permiten que los microorganismos obtienen energía para subsistir y fragmenten moléculas de azúcares para llevar a cabo la producción de subproductos como CO_2 y etanol. Los microorganismos que dan lugar a este tipo de fermentación se caracterizan por su capacidad para vivir en ambientes ausentes de oxígeno, especialmente cuando se están produciendo reacciones químicas, por esta razón se establece que la fermentación es un proceso anaeróbico en totalidad. Además, es un proceso por el cual se libera energía, es decir que es exotérmico, ya que por cada molécula de glucosa procesada se generan 2 moléculas de ATP. La entalpía libre (identificada como energía libre de Gibbs) da lugar a un tipo fermentación que tiene un valor de $\Delta G = -234.6 \text{ Kj. Mol}^{-1}$, lo que determina que es un proceso químico espontáneo.

Figura 39

Procesos fermentativos



Fuente: Cabrera, (2017).

6.5. Aceptores de electrones alternativos además del oxígeno.

Según Madigan (2015), además del oxígeno, también se pueden utilizar aceptores de electrones alternativos, un proceso denominado respiración anaeróbica. Esta sección profundizará en estas reacciones, enfocándose en: los principios de la respiración anaeróbica, la reducción y desnitrificación de nitratos, la bioquímica de la reducción de estos y la reducción de sulfatos y azufre (pág. 436-440)

6.5.1. Conceptos de respiración anaeróbica

Las bacterias que participan en la respiración anaeróbica poseen cadenas de transporte de electrones que presentan las proteínas transportadoras de electrones estándar que se observan en la respiración aeróbica, la fotosíntesis y la quimiolitotrofia, incluidos citocromos, quinonas y ferrosulfoproteínas, entre otras. En ciertos organismos, entre ellos las bacterias desnitrificantes, la respiración aeróbica y anaeróbica están en constante competencia; en tales casos, el cuerpo tiende a favorecer la respiración aeróbica cuando hay oxígeno disponible. Otros organismos que son anaerobios estrictos y obtienen la energía mediante la respiración

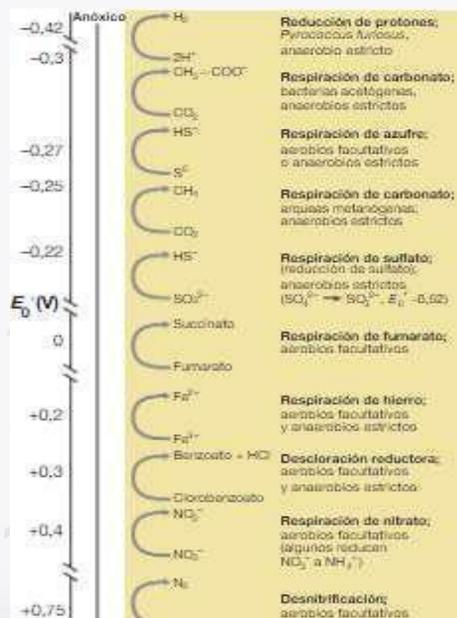
anaerobia, lo que implica que no pueden utilizar el oxígeno para respirar, siendo este gas potencialmente letal para ellos.

6.5.2. Aceptor alternativo de electrones y sistema de escala redox.

Cuando se utiliza oxígeno como aceptor de electrones en la oxidación de un donador, se desprende más energía que cuando se emplea un aceptor de electrones diferente para la misma reacción de oxidación del mismo compuesto, las distinciones en energía quedan claras al examinar los potenciales de reducción de cada aceptor, como se ilustra en la figura 40. Dado que el par O₂/H₂O exhibe la electropositividad más alta, la utilización de O₂ como aceptor terminal de electrones da como resultado una mayor liberación de energía en comparación con cualquier otro aceptor. Normalmente, los organismos que dependen de estos aceptores no son aerobios facultativos, lo que significa que están comprometidos con esta forma de existencia anaeróbica.

Figura 40

Mecanismos más usados por la respiración anaeróbica.



Fuente: Madigan, 2015; p437.

6.5.3. Reducciones asimiladoras y desasimiladoras.

Varios organismos utilizan compuestos inorgánicos como lo son los nitratos, CO₂ y sulfatos reducidos como muchos microorganismos para obtener nitrógeno, carbono celular y azufre; en estos mecanismos de producción, los resultados finales consisten en grupos amino de aminoácidos y compuestos nitrogenados, grupos sulfhídricos de diversas sustancias celulares de azufre y el carbono orgánico presente en todos los contribuyentes de las células. Cuando el nitrato, el sulfato o el CO₂ se reducen para este propósito, se los denomina asimilados, y la fase de reducción se denomina reducción asimilatoria. Para diferenciar entre estas dos formas de reducción, la utilización de estos compuestos como aceptores energéticos de electrones se identifica como reducción desasimilativa.

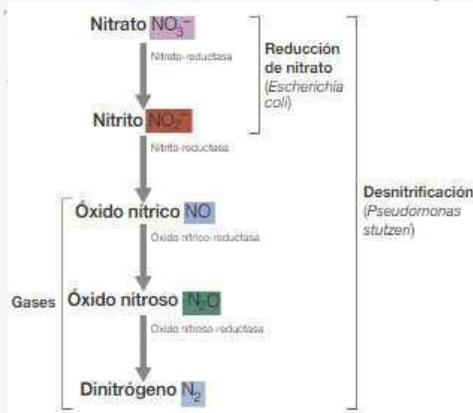
Existen diferencias significativas en los metabolismos asimilatorios y desasimilatorios, el primer metabolismo reduce solo la cantidad suficiente de compuestos (dióxido de carbono, nitratos, sulfatos) para cumplir con los requisitos de la biosíntesis, los productos finales se transforman finalmente en componentes celulares como macromoléculas u otras moléculas biológicas. Por el contrario, en el metabolismo desasimilativo, una cantidad significativa del aceptor de electrones se reduce, lo que da como resultado moléculas excretadas más pequeñas, como nitrógeno, azufre de hidrógeno o metano. Si bien la mayoría de los organismos participan en diferentes formas de metabolismo asimilatorio, sólo un número limitado llevan a cabo un metabolismo desasimilador.

6.5.3.1. Fase Reductora de nitrato y desnitrificación.

Entre los aceptores de electrones más utilizados en la respiración anaeróbica, como se describe en la Tabla 1, se encuentran los compuestos de nitrógeno inorgánicos, muestran los estados de oxidación del nitrógeno inorgánico con sus formas más importantes. El nitrato (NO₃) sirve como uno de los aceptores alternativos más utilizados para la desasimilación, capaz de reducirse a nitrito (NO₂) al ganar dos electrones, o transformarse aún más en óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) y moléculas nitrógeno (N₂). El NO, el

N₂O, y el N₂, al estar catalogados como gases tiene la capacidad de expandirse a nivel ambiental, y sus productos biológicos se denominan desnitrificación, como se ilustra en la figura 41. Un numero de organismos solo se materializa en la etapa de inicio y en condiciones en donde carece el oxígeno las enzimas se desinhiben tras hacerse presentes

Figura 41 Fases de reducción desasimilatoria de nitrato



Fuente: Madigan, 2015; p438.

Tabla 1. Aceptores de electrones comunes en la respiración anaeróbica

Compuesto	Estado de oxidación del átomo de N
N orgánico (—NH ₂)	-3
Amoniaco (NH ₃)	-3
Gas nitrógeno (N ₂)	0
Óxido nitroso (N ₂ O)	+1 (promedio por N)
Óxido nítrico (NO)	+2
Nitrito (NO ₂ ⁻)	+3
Dióxido de nitrógeno (NO ₂)	+4
Nitrato (NO ₃ ⁻)	+5

Fuente: Madigan (2015).

6.5.3.1.1. Bioquímica de la reducción desasimilatoria de nitrato

En la figura 42 se ilustra dinámicamente la comparación de las vías de transporte de electrones llevada a cabo en la respiración aeróbica, de nitratos y desnitrificación. En la

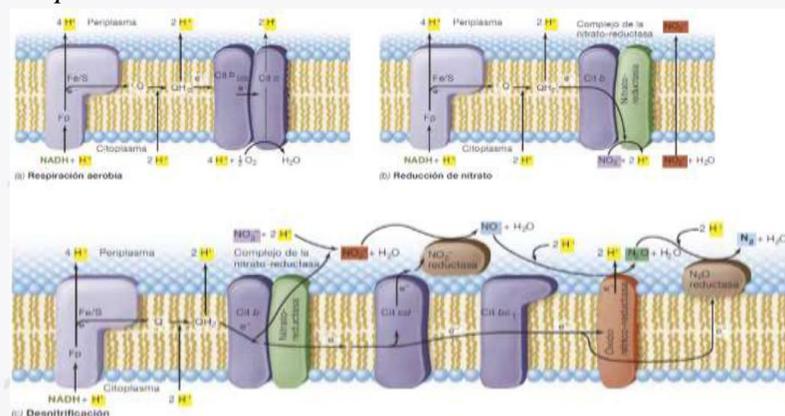
reducción desasimilatoria de nitrato, la primera fase es catalizada por la enzima nitrato-reductasa, una enzima de membrana que contiene molibdeno y su proceso de síntesis se ve intervenido e inhibido por el oxígeno. El nitrito (NO_2), es el primer producto de la reducción del nitrato, seguido de la reducción del nitrito a óxido nítrico (NO) por la nitroreductasa; algunos organismos pueden llevar a cabo una reducción adicional del nitrito a amonio (NH_3) en un proceso desasimilador, pero la desnitrificación es aspecto más destacado de este proceso desasimilador, porque un número de productos, en particular el óxido nítrico y nítrico, ocasionan un impacto en el medio ambiente.

Se ha estudiado a detalle la bioquímica en base a la reducción desasimiladora de nitrato en *E. coli*, donde el nitrato pasa un proceso de reducción limitado hasta óxido nítrico y en *Paracoccus denitrificans*, se completa el proceso de desnitrificación. En *E. coli*, la nitrato-reductasa utiliza electrones de

en lo que se producen desnitrificación. Como se ilustra en la figura 42, la nitrato-reductasa de *E. coli* emplea electrones originarios de un citocromo b, que compara la cadena de transporte de electrones entre células que llevan a cabo la respiración nitrativa y las células de *E. coli* aeróbicas.

Figura 42

Respiración anaeróbica basada en el nitrato.



Es necesario distinguir entre el metabolismo de los sulfatos considerado como un agente anabólico o un agente desasimilatorio, como es el caso de los nitratos. Varios organismos, hongos, plantas, algas, y un número de procariontes contienen sulfato para satisfacer sus necesidades de azufre biosintético; esta es una forma de metabolismo anabólico. Por otro lado, la capacidad de generar energía utilizando sulfato como aceptor de electrones involucra la reducción a un alto nivel y está restringida a las bacterias reductoras de sulfato. Estos organismos generan H₂S en cantidades elevadas y es excretado por la célula, dejándolo libre para ser oxidado a nivel aéreo, utilizado por otros organismos o unirse con metales para llevar a la formación de sulfuros metálicos.

Tabla 2

Proceso reductor del azufre

Tabla 13.8 Compuestos de azufre y donadores de electrones para la reducción del sulfato	
Compuesto	Estado de oxidación del átomo de S
<i>Estados de oxidación de compuestos de azufre fundamentales</i>	
S orgánico (R-SH)	-2
Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	-2
Azufre elemental (S ⁰)	0
Tiosulfato (-S-SO ₃ ²⁻)	-2/+6
Dióxido de azufre (SO ₂)	+4
Sulfito (SO ₃ ²⁻)	+4
Sulfato (SO ₄ ²⁻)	+6
<i>Algunos donadores de electrones utilizados para la reducción del sulfato</i>	
Hidrógeno molecular	Acetato
Lactato	Propionato
Piruvato	Butirato
Etanol y otros alcoholes	Ácidos grasos de cadena larga
Fumarato	Benzoato
Malato	Indol
Colina	Varios hidrocarburos

Fuente: Madigan, 2015.

6.5.3.2 Mecanismos Bioquímicos y energéticos de sulfato reducción.

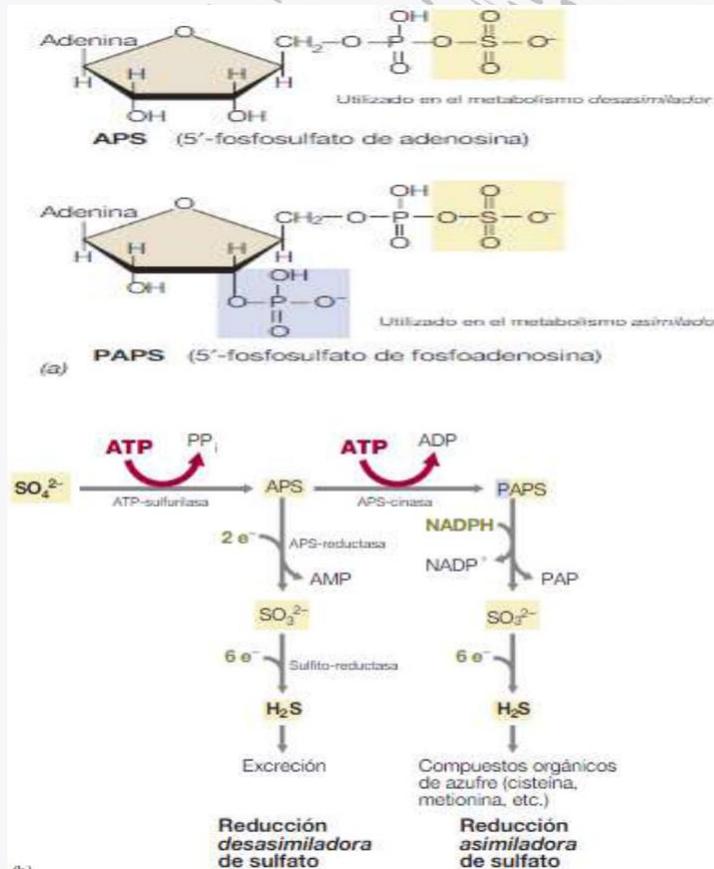
A pesar de que el sulfato es un aceptor de electrones que presenta menor favorabilidad en comparación con el oxígeno o nitrato, la reducción del sulfato proporciona energía libre suficiente para sintetizar ATP, dando como producto NADH o FADH debido a la oxidación de un donador de electrones; Casi el número total de especies microbianas necesitan de hidrógeno (H₂), y restringen la utilización de otros donadores.

Un ejemplo claro es el piruvato y lactato que son solicitados por especies que viven en hábitat anóxicas de agua de ríos o dulces, mientras que las bacterias reductoras de sulfato marinas, requieren en su mayoría a acetato y cadenas extensas de ácidos grasos.

La fase en la cual se pasa de reducción de sulfato a sulfuro de hidrógeno es compleja, implica la transferencia de 8 electrones y avanza a través de múltiples etapas intermedias. Antes de que pueda ocurrir la reducción de sulfato, se requiere ATP para activar el compuesto en una reacción. La enzima responsable de catalizar la combinación de sulfato con un ATP fosfato, dando como resultado la formación de adenosina fosfosulfato, se conoce como ATP-sulfurilasa (figura 43). Este paso de activación aumenta significativamente el potencial reductor del par SO₄/SO₃, lo que hace posible que el sulfato se reduzca utilizando donadores de electrones como NAPH. En la reducción disasimilativa del sulfato, la APS reductasa media en la liberación de AMP, se lleva a la reducción específica del sulfato de APS a SO₃²⁻. En la reducción por asimilación, la formación de fosfoadenosina fosfosulfato requiere la adición de un fosfato APS antes de que se pueda reducir el sulfato. Independientemente de la vía de reducción, el resultado final de la reducción del sulfato es siempre SO₃.

Figura 43

Reducción de sulfato a nivel bioquímico



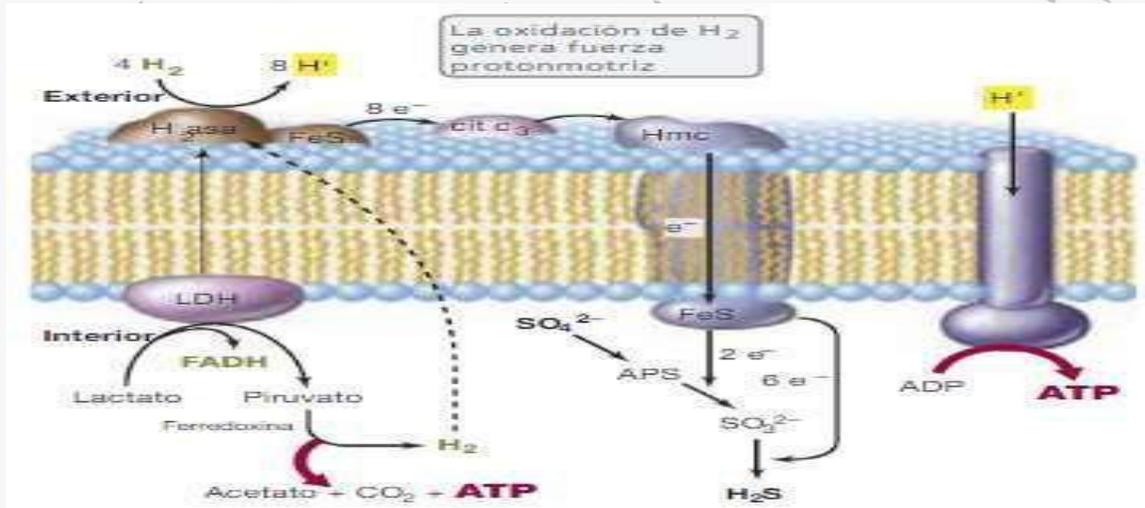
Fuente: Madigan, 2015; p440).

En la etapa responsable de la reducción desasimiladora de sulfato, las reacciones que se generan en el transporte de electrones emplean una fuerza denominada fuerza protomotriz, la cual de incitar la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) influenciada por la actividad que ejerce la ATPasa. El transportador crítico de los electrones es denominado *c3* en esta fase, y también recibe el nombre de citocromo, estos se pueden expresar en c. periplasmático de bajo potencial (figura 44). Los electrones de hidrogenasa periplasmática es aceptada por el citocromo *c3* y se traslada al complejo membranal con gran número de proteínas a su alrededor. Esta fase o complejo es llamada *Hmc*, y tiene el trabajo de transportar a los

electrones y los trasladar a las enzimas APS/reductasa y sulfito reductasa, posteriormente se encargan de la producción de sulfito y sulfuro, este proceso se lleva a cabo mediante la membrana citoplasmática.

Figura 44

Fijación Energética y transporte de electrones en bacterias sulfato reductoras



Fuente: Madigan, 2015; p440.

UNIDAD 5. INTERACCIONES MICROBIANAS EN SU ENTORNO

7. Hábitat microbiano

Peña (2017) determina que los microbios son ubicuos, ya que colonizan una amplia gama de hábitats en el planeta, mostrando una adaptabilidad a condiciones extremas variadas, ellos se encuentran desde los suelos que pisamos hasta océanos, aire que respiramos, cuerpo de plantas, alimentos, cuerpo humano e incluso en entornos hostiles. Si bien, presentan roles tanto benéficos como potencialmente perjudiciales que ayudan a comprender la dinámica de los ecosistemas; estos organismos pueden habitar en diversidad de entornos, desde lugares aptos para satisfacer sus necesidades nutricionales y funciones hasta lugares con recursos limitados o casi nulos; además presentan roles importantes en la biósfera ya que fijan gases atmosféricos y descomponen materia orgánica para iniciar la cadena alimentaria y suplir sus necesidades, participan en la ciclación de nutrientes, producción de alimentos y medicamentos y regulaciones climáticas. Dentro de sus beneficios significativos se resalta la producción de medicamentos, alimentos y la elaboración de productos biotecnológicos actuales, su capacidad para descomponer materia orgánica y su participación en procesos fermentativo resaltan su actividad y aporte a la evolución; de la misma manera, han demostrado ser invaluable en el tratamiento de aguas residuales y desechos, incluyendo sustancias tóxicas que actúan mediante procesos bioquímicos que ayudan a depurar y descontaminar. Por otra parte, trabajan en pro a la biorremediación, mediante la producción enzimática que mejora la calidad del suelo contaminado o maltratado por las actividades humanas, facilitando la restauración de los ecosistemas.

7.1. Microbioma- microbiota

Según Alarcón et al; (2016) los seres humanos viven asociados en un gran número de microorganismos que se encuentran en partes de la boca, piel, tracto gastrointestinal y el sistema genitourinario femenino, que se denominan microbiota normal humana, esta definición ha tomado evolución como se ve en la tabla 3, desde la flora comensal hasta el microbioma.

Tabla 3

Cambios evolutivos en la denominación de las comunidades microbianas.

Concepto	Definición	Referencia
Flora comensal	Conjunto de microorganismos que cohabitan, la mayor parte de los cuales desarrolla relaciones simbióticas de mutualismo con el huésped y protegen del ingreso de otros potencialmente patógenos	Sarkis K. Mazmanian and Dennis L. Kasper. <i>Nature Reviews</i> , 2006
Microbiota	Comunidades de microorganismos que habitan en forma estable en un sitio anatómico y que interaccionan entre sí, autorregulando su concentración numérica y dinámica metabólica, la que puede influir en el estado de salud o enfermedad del huésped	Matthew R. Redinbo. <i>J. Mol. Biol.</i> , 2014 Jonathan S. Bromberg, y col. <i>Nature Reviews</i> , 2015
Microbioma	Relación entre el huésped y la comunidad microbiana de un sitio anatómico, donde confluye una compleja interacción de factores genéticos, ambientales y metabólicos, los que pueden inducir la expresión o manifestación de una respuesta fisiológica o patológica en el individuo	Jonathan S. Bromberg, y col. <i>Nature Reviews</i> , 2015

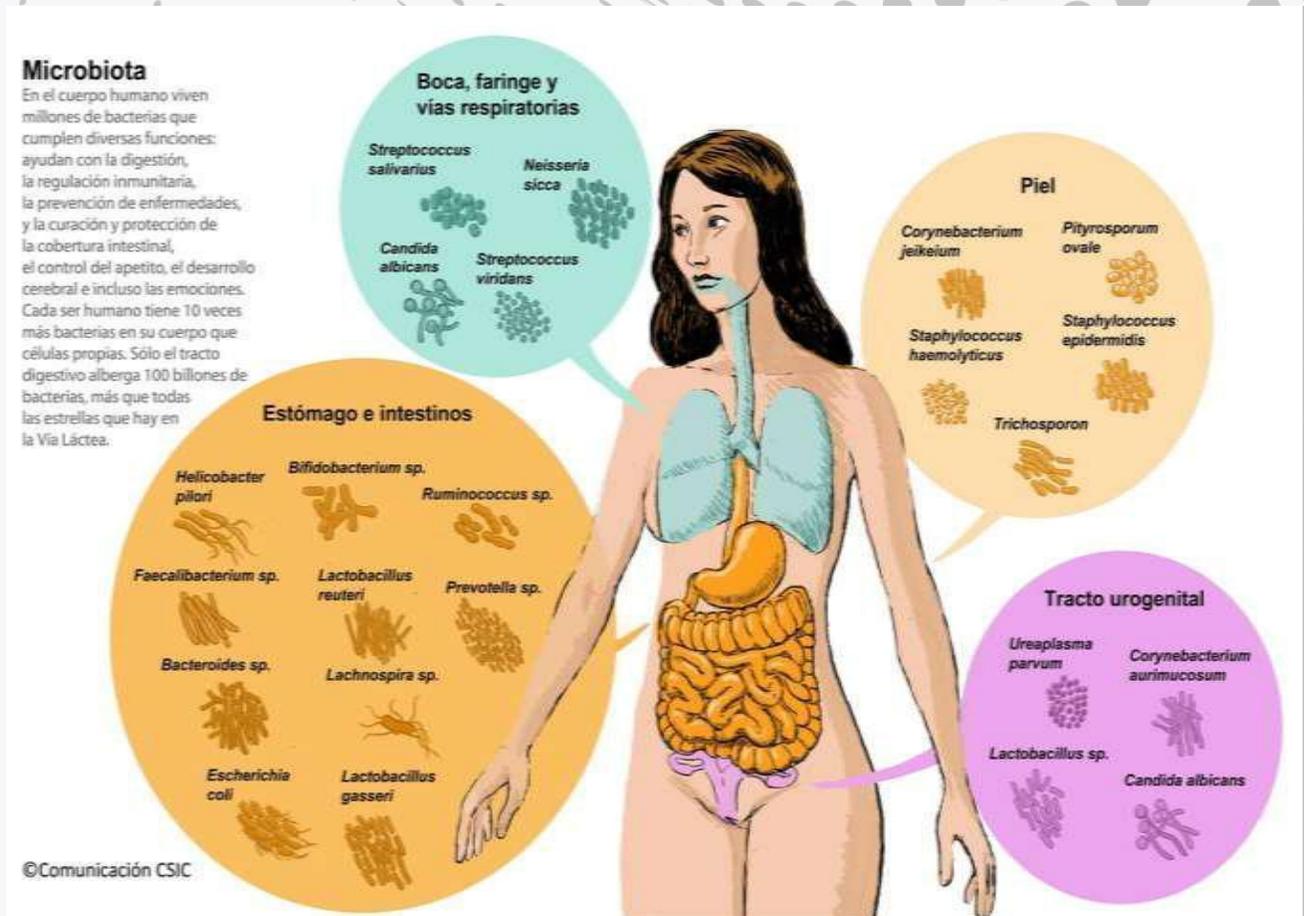
Fuente: Alarcón *et al.*, 2016.

7.1.1. Microbios albergados en el cuerpo

Los microbios que coexisten en nuestro cuerpo, conocidos como el microbiota humano, forman un ecosistema diverso y dinámico que coloniza diversas regiones como la piel, boca, tracto gastrointestinal y las vías respiratorias. Si bien, algunas comunidades microbianas contribuyen en la regulación del sistema inmune proporcionando una barrera contra patógenos y benefician la salud intestinal; sin embargo, algunos pueden invadir el hospedero humano y causar patologías, que van desde enfermedades no infecciosas hasta crónicas como cierto tipo de neoplasias o enfermedades cardiacas. Para que se dé la infección por parte de este tipo de microorganismos, deben ingresar al cuerpo por medio del tracto respiratorio (en mayoría zonas mucosas), tracto urogenital, gastrointestinal o a través de cortaduras en la piel (figura45)

Figura 45

Microbiota a nivel del cuerpo humano



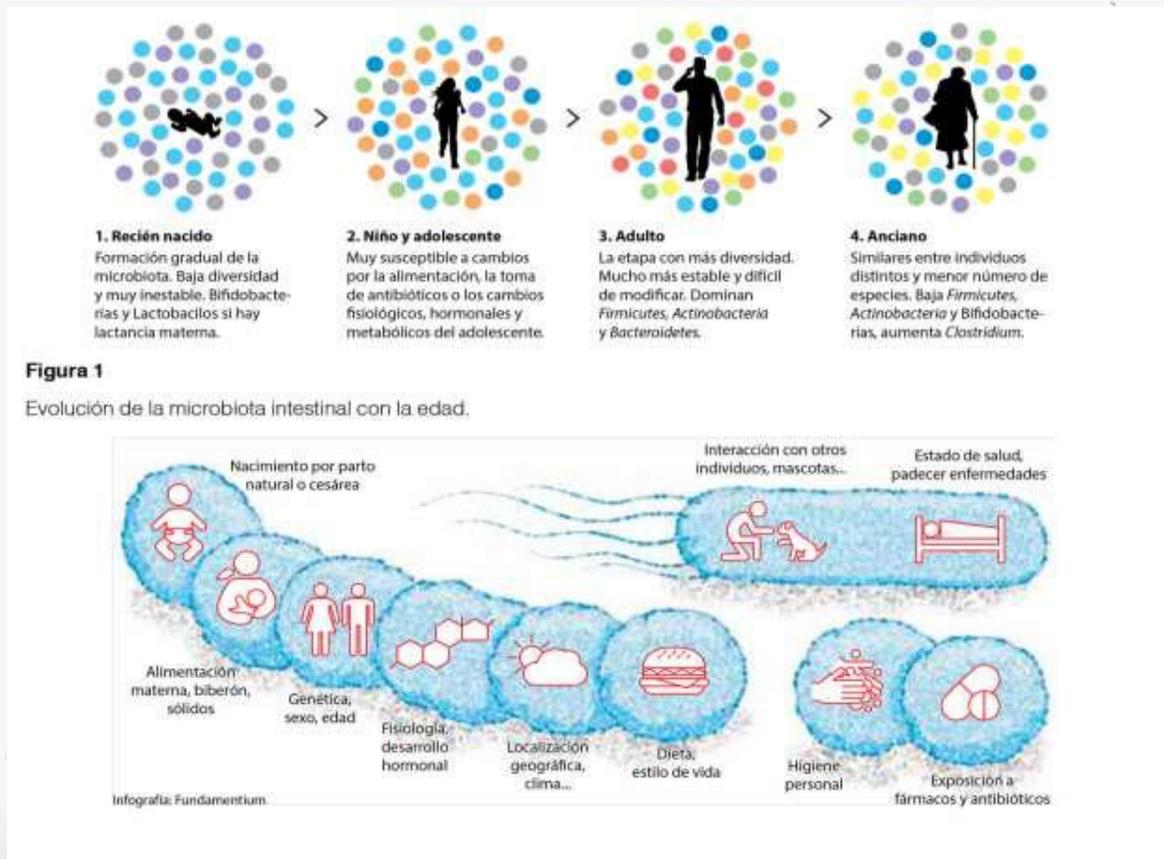
Fuente: CSIC, 2015.

Según lo mencionado por López (2020) el modo de nacimiento influye significativamente en la composición y desarrollo del microbiota, especialmente en bacterias que se dirigen hacia el intestino y lo colonizan. Cuando un bebé nace por vía vaginal, entra en contacto directo con el microbiota de la madre, en especial con bacterias que se encuentran en el área o canal de parto; este primer paso es importante ya que las bacterias que primeramente colonizan la parte intestinal del individuo recién nacido, provienen de la microbiota vaginal y fecal de la madre. Géneros bacterianos como *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* son predominantes en este tipo de casos e intervienen en la digestión de la leche materna y la

protección contra patógenos, estableciendo un sistema inmune resistente para el individuo. Por otro lado, los bebés nacidos por cesárea no tienen contacto inicial con la zona vaginal-fecal, su primera exposición suele venir del entorno o de la piel de la madre, lo que resulta un microbiota inicial diferente que colonizan microorganismos que se encuentran mayormente en pieles o ambientes hospitalarios. Por otra parte, los individuos prematuros suelen tener una microbiota menos diversa y estable debido a que su sistema inmune no se encuentra bien desarrollado. La forma de alimentación aporta significativamente en el desarrollo del microbiota, la leche materna tiene un complejo de nutrientes, anticuerpos y enzimas que la fortalecen, conformada por un 30% de bacterias; mientras que la leche de fórmula puede carecer de compuestos bioactivos, como se puede visualizar en la figura 46.

Figura 46

Evolución de la microbiota y factores determinantes



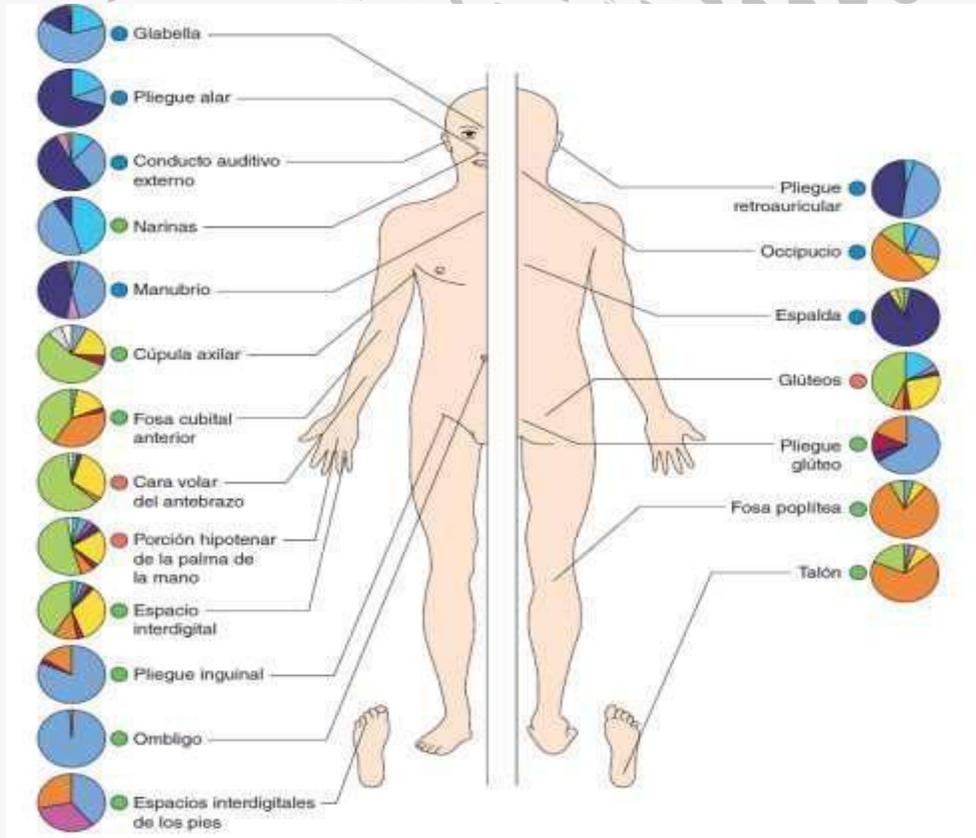
Fuente: López, 2020.

7.1.1.1. Piel y manos

Es un ecosistema complejo y diverso de los más grandes, compuesto por una multitud de microorganismos como se observa en la figura 47. Ella adopta un gran número de microorganismos que va desde 1×10^7 células/cm² debido a que varía significativamente según la región del cuerpo y su constante exposición al entorno que incluyen la higiene, la edad, el sexo, entre otros. Este microbiota no solo está compuesto por microorganismos transitorios o pasivos, sino que muchas de estas bacterias están adaptadas a ciertas zonas específicas del cuerpo en donde encuentran las condiciones propicias para su supervivencia y desarrollo, adaptándose a los cambios de la piel, exposiciones a rayos UV, detergentes, resequedad e incluso cosméticos. Variedad de investigaciones sobre la composición bacteriana con relación a la piel han expuesto una elevada variabilidad entre distintos individuos que se denomina *intervariabilidad* y dentro de un individuo se le llama *intravariabilidad*. Las palmas de las manos específicamente presentan un ambiente único en comparación con otras áreas de la piel que influyen en la composición del microbiota lo que lo cataloga con gran variabilidad microbiana e interacciona con el sistema inmune para trabajar en resistencia, esto destaca su importancia en la salud de la piel y prevención de enfermedades

Figura 47

Microbiota a nivel de piel



Fuente: Gutiérrez,2014

7.1.1.2. Microbiota bucal

Es un ecosistema dinámico y muy heterogéneo, el exceso de los residuos nutricionales en la boca puede generar en un ambiente óptimo para el crecimiento microbiano, aunque la saliva a la lisozima que funciona como componentes bacterianos y se encarga del rompimiento de la lactoperoxidasa y el peptidoglicano. Además, la saliva contribuye en la lubricación, la dispersión inicial de carbohidratos y la protección de tejidos bucales; sin embargo, cuando los nutrientes provenientes de los alimentos y bebidas no se eliminan adecuadamente mediante la higiene oral, dan vía para que variedades de microorganismos pueden proliferar. Esta composición de la microbiota oral está denominadas por bacterias que se pueden

clasificar en diferentes grupos según su capacidad para ejercer en presencia de oxígeno o sin él, dentro de las más comunes se encuentran los *Streptococcus sobrinus*, *S. mutans*, quienes poseen roles específicos en la cavidad oral y son capaces de fermentar carbohidratos y producir ácidos que llevan a la desmineralización del esmalte dental y generar caries y el exceso de bacterias patógenas puede ser un medio para producir enfermedades periodontales

7.1.1.3. Microbiota faríngeo

La faringe alberga principalmente una flora compuesta por *Streptococcus a* hemolíticos, quienes permiten el equilibrio del microbiota en esta región del tracto superior, las cuales son comúnmente encontradas y pueden ser tanto comensales normales como patógenos. En las fosas nasales se encuentran microbios de tipo cutáneo como *Staphylococcus epidermidis* y algunas especies de *Corynebacterium*, las cuales son características de la piel y pueden colonizar fosas nasales y sus alrededores; en esta fase se resalta *S. aureus* quien se encuentra en un 30% de individuos portadores sanos. A nivel faríngeo se encuentran diversas especies de *Moraxella*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Moraxella*, entre otros, también es muy común la colonización por la especie *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus* en preescolares. Por otra parte, predominan los anaerobios aislados en la faringe destacando especies como *Bifidobacterium spp.*, *Peptoestreptococcus spp.*, y *Actinomyces spp.* Además de los anaerobios también predominan los bacilos Gram negativos destacando a *Fusobacterium spp.* y *Bacteroides spp.*, quienes colonizan fácilmente estas áreas de la faringe. Por otra parte, la producción de componente orgánico en las criptas de las amígdalas reduce el potencial redox y favorece la proliferación anaerobia de manera significativa en este espacio. En ciertos individuos es sencillo que se lleve a cabo la colonización de *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* como portadora, sin causar afecciones; de igual manera se pueden encontrar especies no patógenas como *Neisseria* y *Streptococcus β* hemolíticos que no hacen parte del grupo A. La glotis es el área bacteriana limitante, es decir que no se pueden encontrar bacterias más allá de ella; Sin embargo, la flora orofaríngea tiene un rol en las patologías pulmonares que se desarrollan por el contacto con estos microorganismos y ocasionar alteraciones complicadas.

7.1.1.4. Microbiota de las mucosas

En áreas suficientemente húmedas y membranosas por causa de las mucosas, se encuentran microorganismos como estafilococos, estreptococos y parte de cocos Gram negativos inofensivos y poco comunes que pueden ingresar mediante la exposición al aire y al ambiente externo. Además, pueden coexistir microorganismos como *S. aureus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* como potenciales patógenos, aunque su proliferación es retenida por el microbiota normal y el trabajo del sistema inmune local. En contraste, el tracto respiratorio inferior tiene una interacción equilibrada entre la microbiota y las defensas y las bacterias son eliminadas mediante secreciones nasales y saliva por el empuje que genera el epitelio ciliado de las paredes.

7.1.1.5. Microbiota pulmonar normal

El sistema respiratorio está dividido según la anatomía en dos sectores uno bajo y otro alto, en individuos sanos sólo las fosas nasales y faríngeas (alto) alberga una flora bacteriana normal, estas estructuras están adaptadas para filtrar, calentar y humidificar el aire que inhalamos optimizando el paso a vías respiratorias superiores. La nariz por su cavidad nasal dividida por el tabique es la primera línea de defensa contra partículas y se reviste de pequeños cilios y glándulas productoras de mucosidad desencadenando un proceso activo y a su vez filtra los microbios que se encuentran en el tracto respiratorio. Esta mucosidad es rica en lisozima y lactoperoxidasas, actuando como barreras protectoras; los gérmenes al ingresar tienen contacto con el tejido linfoide del anillo de Waldeyer, y se hacen presentes mecanismos de defensas como la broncoconstricción y la tos como reflejos. Además, la mucosa respiratoria está enriquecida con inmunoglobulinas tipo A para controlar estos procesos.

El microbiota pulmonar, que está influenciada por diversos factores como el clima, la geografía, el entorno de vida y la exposición a animales domésticos, guarda semejanza con el microbiota digestivo. Sin embargo, es importante señalar que la composición del tracto respiratorio inferior (pulmones, bronquios) difiere significativamente de la del tracto

respiratorio superior (nariz, boca). Si bien su función exacta aún no está clara, el microbiota pulmonar podría proporcionar protección contra la inflamación inducida por alergias. Existen numerosos factores, tanto relacionados con el organismo como ambientales, que pueden disminuir la diversidad bacteriana y alterar el equilibrio del microbiota respiratorio. Esta disbiosis puede crear un entorno favorable para el crecimiento de bacterias u hongos patógenos, contribuyendo así al desarrollo de enfermedades respiratorias crónicas como el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

7.1.1.6. Microbiota normal de la uretra anterior

El sistema urinario suele ser estéril excepto la parte frontal de la uretra, en lo que respecta la orina tiene propiedades germicidas debido a su arrastre y alta osmolaridad, que ayudan a mantener limpio el tracto urinario, junto con su pH ácido y cuando se produce la micción, las bacterias del perineo se eliminan de la uretra anterior; este mecanismo se utiliza para la recolección de urocultivos a mitad de camino para evitar la contaminación. En el género femenino, la mayor incidencia de infecciones urinarias puede explicarse en parte por la longitud más corta de la uretra y su proximidad a la región anal. Lo que lleva a determinar que las infecciones en esta área generalmente son causadas por microorganismos que primero infectan las áreas circundantes antes de ascender a lo largo de la vejiga o incluso los riñones. Algunas condiciones que predisponen a las personas a tales infecciones incluyen obstrucciones en cualquier nivel en el flujo de orina después de su formación por malformaciones o el uso de catéteres, entre otros factores y esta flora normal se encuentra habitada por bacterias del género *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacterias*.

7.1.1.7. Microbiota vaginal normal

Döderlein describió por primera vez en 1892 la composición normal de la flora normal vaginal observada en mujeres en edad para reproducirse, esta flora está muy influenciada por los niveles de estrógeno. La estimulación hormonal conduce al crecimiento de células epiteliales que almacenan glucógeno; *Lactobacillus* spp. Utiliza este glucógeno y produce ácido láctico como subproducto, lo que provoca una acidificación significativa de la vagina

y la inhibición de muchas bacterias. En este punto predominan las especies de *Lactobacillus* junto con otros bacilos Gram positivos, complementados con un número pequeño de cocos Gram positivos como *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp., Actinomyces, Bacteroides (bacilos Gram negativos anaerobios), Enterobacteriaceae entre otras están presentes en pequeñas cantidades mientras que *Streptococcus agalactiae* también se puede encontrar en porcentajes variables.

La densidad de *lactobacillus* en la flora vaginal aumenta a medida que avanza el embarazo; Sin embargo, los bacilos gramnegativos anaerobios y facultativos disminuyen por lo que tienen como objetivo reducir el riesgo de bacteriemia grave a lo largo del trabajo de parto y el período posparto, aunque la cantidad de levadura también puede aumentar y provocar síntomas con el tiempo. Aunque la enfermedad en las mujeres no es típica de *Streptococcus agalactiae* (grupo B), su presencia indica riesgos importantes para el recién nacido que conducen al desarrollo de enfermedades graves, ya que esto comprometería aún más la inmunidad del niño. Durante la prepubertad, la flora vaginal está compuesta principalmente por gérmenes de origen cutáneo y perineal como *S. epidermidis* y *Propionibacterium* spp., las levaduras también están presentes en cantidades mínimas junto con algunas enterobacterias y bacilos anaerobios gramnegativos. Para las mujeres posmenopáusicas, al cesar el estímulo hormonal la flora vaginal tiende a volver al patrón infantil observado en años anteriores.

7.1.1.8. Microbiota normal del estómago

El papel de la flora intestinal es vital, no sólo en el desarrollo de la mucosa intestinal sino también en diversos procesos metabólicos que involucran ácido fólico, biotina, vitamina B12 y otras sustancias como la vitamina K y E. La producción de inmunoglobulinas A, a través de la inmunotolerancia se debe en gran medida a la flora; Además, actúa como un importante estímulo antigénico que conduce además a ciclos enterohepáticos con fármacos como el cloranfenicol, que también contribuye significativamente a su actividad. Sin embargo, no se detiene ahí ya que éste también actúa como una barrera al llenar el espacio dentro de nichos ecológicos (impidiendo que otras bacterias potencialmente patógenas se establezcan) la

interferencia bacteriana, un concepto ilustrado de gran importancia. Las bacterias dentro de los intestinos no dependen simplemente de un arma, sino que también fabrican bacteriocinas, una clase de toxinas mortales para bacterias distintas a las de su propia especie, como se visualiza en la figura 48. Sin embargo, hay situaciones en las que las bacterias pueden liberarse de sus confines intestinales y entrar en la cavidad peritoneal debido a bloqueos mecánicos o perforaciones en el sistema digestivo; esto allana el camino para infecciones oportunistas o endógenas que podrían provocar enfermedades mortales.

Figura 48

Microbiota a nivel estomacal



Fuente: Eurecat, sf

7.1.1.9. Microbiota intestinal delgada

Intestino delgado: el duodeno hay un límite de crecimiento microbiano debido al mantenimiento del pH. La peristalsis es un mecanismo de gran importancia ya que permite mantener poblaciones bacterianas bajas. Por otra parte, la bilis tiene puede inhibir variedad de bacterias ya que contienen propiedades antibacterianas. Otras sustancias, como lo son las lisozimas y la IgA secretora, también ayudan a mantener un número mínimo a nivel microbiano. En el íleon es donde comúnmente el número de bacterias se y en la parte distal del intestino delgado, la flora tiene semejanza con las colonias bacterianas. A nivel del íleon terminal la concentración es de 10^6 a 10^8 bacterias/mililitro de contenido a nivel intestinal, predominando los anaerobios.

7.1.1.10. Microbiota intestinal gruesa

Las bacterias conforman el 40% de pesos de la materia fecal aproximadamente. Es probable que el incremento del contenido de bacterias se deba a una disminución de la peristalsis, lo que conduce a un aumento del pH hacia un valor fisiológico y a una disminución del contenido de agua. Los microbios que se encuentran en la flora llegan a una concentración que va desde 10^7 y 10^9 bacterias/ml al pasar a través de la válvula ileocecal, y las cifras alcanzan su punto máximo en el recto, donde hay alrededor de 10^{11} bacterias por ml, este medio intestinal se resalta como el ecosistema microbiano más grande y complejo del cuerpo, alojando un número mayor a 500 especies bacterianas distintas, coexistiendo con un predominio de gérmenes de tipo anaerobio. *Bacteroides* y *Fusobacterium* son los géneros principales entre los bacilos gramnegativos, y entre los cocos se encuentran *Veillonella*, *Peptostreptococcus*, *Sarcina*. Por otra parte, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, y *Clostridium* son ejemplos de bacilos Gram positivos.

Las bacterias del intestino muestran una gran cantidad de anaerobios facultativos, con las enterobacterias a la cabeza; entre ellos, *E. coli* es el miembro más destacado seguido de las especies *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, y *Citrobacter*. Los cocos grampositivos están conformados por especies de *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. La colonización del intestino comienza en el nacimiento, en el caso de neonatos, los primeros microbios del sistema digestivo proceden del perineo y conductos vaginales de la madre. Por lo general, consisten en *E. coli*, *Klebsiella* spp., algunas especies de *Enterococcus* y, en pocas ocasiones se da lugar a especies de *Clostridium*; en lactantes también se pueden determinar *amamantados*, *Bifidobacterium* spp. La población de gérmenes aumenta cuando se introduce la alimentación artificial, tanto en número como en variedad. Durante el primer año del bebé, su flora intestinal sigue siendo similar a la de un adulto después de la infancia.

7.1.1.11. Microbiota de la mucosa bucal

En áreas de la cavidad bucal, a nivel superficial las mucosas se encuentran en exposición al flujo de la saliva, zonas donde se pueden adquirir microorganismos como *Streptococcus mutans*, quienes sobreviven en este tipo de ambiente formando colonias que se adhieren en superficies de las mucosas o se incrementan en la saliva y las velocidades aleatorias superan las provocadas por la saliva. Se cree que la transmisión de bacterias asociadas con la flora materna durante los dos primeros días de vida son los dos días críticos para la contaminación bacteriana de la cavidad bucal, por lo tanto, si se desarrolla un protocolo para evitar la transmisión de madre a hijo durante las primeras 48 horas, el microbiota adquirido se puede controlar y alterar, reduciendo así potencialmente la prevalencia de futuras caries.

Excluyendo a las encías y los labios, el microbiota de las mucosas está compuesta en su mayoría de cocos grampositivos anaerobios facultativos, particularmente *Streptococcus viridans*. Los labios están establecidos como la zona de transicional de la piel a la mucosa y estas son colonizadas por la microbiota cutánea de especies del género *Micrococcus* y *Cucurobacter* y especies *Staphylococcus epidermidis*; debido al efecto humectante de los labios, se detectan grandes cantidades en la saliva y la mucosa; Dorso de la lengua de *Streptococcus viridans*, quienes también dominan la mucosa bucal, siendo *Streptococcus mitis* el más destacado seguido de *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus salivarius* también se lleva a cabo el aislamiento de otros microorganismos que se encuentran en la saliva; el paladar duro contiene una microbiota parecida a la de la mucosa yugal, esta microbiota es estreptocócica. Las bacterias típicas del tracto respiratorio superior se encuentran en el paladar blando, como *Haemophilus*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Streptococcus pyogenes* y *S. viridans*. El microbiota gingival está estrechamente asociado con la placa coronaria lisa en la unión gingival.

Según investigaciones reciente, la mucosa bucal está dominada por varios phylos bacterianos principales: *Firmicutes* en especial los géneros *Streptococcus* y *Veillonellas*, proteobacterias destacando principalmente a *Neisseria*, bacteroides representados por *Prevotella* y *Actinobacteria* específicamente micrococcineae. Se ha destacado que la higiene bucal de las

superficies de las mucosas influye significativamente en la colonización de bacterias como *Treponema denticola* y *Fusobacterium nucleatum*.

7.2. Interacciones a nivel microbiano

Según lo mencionado por Carrillo (2014) el huésped se ve relacionado siempre con variedad de tipos de microorganismos, algunos de ellos incluso cuentan con características benéficas. Estos organismos con los que hemos desarrollado una estrecha relación se denominan microbiota.

Organismo Gnotobiótico: Organismos cuyos microbiomas se conocen. Es diferente de los organismos libres de gérmenes, como un feto dentro del útero.

Parásito: Organismo vivo que tiene como fuente de alimentación a un huésped. Los parásitos no siempre son patógenos

Virulencia: el nivel de patogenicidad que presenta el parásito.

El huésped proporciona un ambiente favorable para los microorganismos, sean considerados agentes patógenos o no. Sin embargo, cada región anfitriona cuenta con distintas. Los microorganismos se encuentran presentes en áreas que se encuentran en exposición al exterior en varias zonas del cuerpo: boca, piel, tracto genitourinario, intestinal e incluso el respiratorio, dan señales de patologías cuando estos se denotan en órganos más internos. Los seres humanos contamos con 400 m² superficie total de mucosa óptima para la proliferación microbiana.

Por otra parte, Tesauro (2013) describe las islas de patogenicidad como agrupaciones de elementos genéticos a nivel genómico de un organismo, en los cuales los genes tienen la capacidad de codificar factores de virulentos.

7.3. El agua como transmisor de variedad de enfermedades

Guzmán y Nava (2015) plantearon que el agua que no se encuentra en las condiciones adecuadas para ingerir puede ser un vehículo de transmisión de variedad de enfermedades que tienen graves consecuencias para la salud pública, como: cólera, tifoidea, hepatitis A, dengue, paratifoidea, malaria, etc. A nivel mundial, se estima que alrededor de 1,7 millones de personas mueren cada año por causa de la calidad deficiente y la falta de saneamiento e higiene del agua (3,1% de todas las muertes y 3,7% del total de años de vida ajustados en función de la discapacidad), principalmente debido a diarrea aguda. Los principales patógenos que afectan a niños con diarrea aguda en niños incluyen *Shigella*, *Rotavirus*, *Escherichia coli enterotoxigénica*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* O1, entre otros, así como la probablemente *Aeromonas* spp, *E. coli enteropatógena*, *Vibrio cholerae* O139, *Bacteroides fragilis enterotoxigénicos*, *Cryptosporidium parvum* y *Clostridium difficile*. Estas enfermedades se pueden prevenir de manera fácil mediante la prevención de contaminantes y la cloración del agua.

7.3.1. Enfermedades transmitidas a través del agua

Tanto los humanos como los animales e incluso los desechos químicos pueden verse afectados por la contaminación de aguas y la producción de enfermedades, como se visualiza en la figura 49, en las cuales se incluye cólera, meningitis, polio, tifoidea, hepatitis, shigelosis y heces acuosas. De manera general, gran número de estas enfermedades tienen medidas de prevención con base a tratamientos críticos del agua antes de consumirla. Este tipo de enfermedades que se transmiten por el agua, tienen origen en organismos acuáticos los cuales cumplen su ciclo vital en este tipo de hábitats y la otra parte se presenta como parásito de animales, como por ejemplo la esquistosomiasis. La causa de estas enfermedades proviene en mayoría de varios tipos de helmintos, incluidos trematodos, tenias, ascárides e histioworms, conocidos colectivamente como helmintos, que infectan a los humanos. Aunque estas enfermedades se controlan y no suelen ser mortales, pueden ser el causal de que los seres humanos tengan dificultades para tener una vida normal y afectar sus capacidades laborales.

El agua, el saneamiento y la higiene tienen un impacto significativo en la salud en general, las enfermedades implicadas directamente con el agua incluyen aquellas causadas por algunos microorganismos y algunas sustancias de origen químico que se encuentran en mayoría en el agua tratada para el consumo humano; enfermedades como la esquistosomiasis, cuyo ciclo de vida es en la presencia de agua, la malaria, cuyo vector de transmisión está relacionado con torrentes de las mismas y otras lesiones; los causados por aerosoles que contienen microorganismos propagan enfermedades como la enfermedad del legionario.

Teniendo en cuenta lo dictado por la OMS, mediante la higiene, el agua aporta a la salud.

Las siguientes son enfermedades que se pueden generar:

- Anemia
- Arsenicosis
- Ascariasis
- Campilobacteriosis
- Cólera
- Toxinas cianobacterianas
- El dengue y el dengue hemorrágico
- Diarrea
- Fluorosis
- Enfermedad del gusano de Guinea (dracunculiasis)
- Hepatitis
- Encefalitis japonesa
- Intoxicación por plomo
- Leptospirosis
- Malaria
- Metahemoglobinemia

- Oncocercosis (ceguera de los ríos)
- Tiña (tinea)
- Escabiosis
- Esquistosomiasis

Figura 49 *Enfermedades transmitidas por el agua*



Fuente: Echavarría y Casanova, 2018.

7.4. Alimentos como transmisores de enfermedades

Según Álvarez (2013) la alimentación es un importante medio de transmisión de microorganismos que pueden ser los responsables de provocar infecciones e intoxicaciones. El período de incubación de estas afecciones suele ser corto (de 2 a 10 horas) y suele manifestarse como un síndrome gastrointestinal (Fig. 50). Dado que la dosis infecciosa mínima (DMI) para algunas de estas enfermedades es muy baja, es fundamental mantener una higiene estricta en los procesos de fabricación y de alimentos. Las enfermedades que son transmitidas por alimentos (ETA) se conocen como el conjunto de signos provocados por el consumo de alimentos, especies, ingredientes, bebidas que contienen suficientes cantidades de gérmenes patógenos y sustancias nocivas. Estas enfermedades identificadas como toxi-infecciones a nivel alimentario se clasifican de forma recurrente como infecciones cotidianas o intoxicaciones.

Infecciones transmitidas por alimentos: Las infecciones de transmisión alimentaria se generan cuando se consumen alimentos que contienen en su interior microorganismos vivos dañinos para el organismo, como bacterias, parásitos, virus; los ejemplos incluyen Virus de la hepatitis A *Salmonella spp*, *Trichinella spiralis*, entre otros.

Intoxicación generada por alimentos: se generan cuando se ingieren toxinas o venenos producidos por hongos o bacterias presentes en los alimentos, incluso si estos microorganismos ya no están presentes en ellos. Ejemplos de estas toxinas son las enterotoxinas, toxina botulínica y estafilocócicas.

Síntomas: Los síntomas de las ETA pueden demorar días e incluyen malestares estomacales, heces acuosas, vómitos y fiebre. En algunos casos, también pueden aparecer síntomas neurológicos, hinchazón de ojos, dificultades para evacuar la orina y visión borrosa, doble. La intensidad y permanencia de los síntomas dependen de factores como el número de bacterias o toxinas a nivel alimentario, la proporción de alimentos ingeridos y el sistema inmunológico de cada persona.

Figura 50

ETAS



Fuente: Pacios *et al.*, 2019.

7.4.1. Causas De las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS)

1. Razones biológicas: bacterias, parásitos, hongos, virus, algas.
2. Razones químicas: sustancias químicas incorporados en la producción de alimentos, productos químicos naturales del alimento.
3. Razones Físicas: cuerpo extraño.

7.4.2. Enfermedades alimentarias más comunes

Hepatitis: Se define como una inflamación a nivel del hígado, generada por infecciones de origen viral por el consumo excesivo de agua o alimentos contaminados y normalmente se halla en saliva, orina, heces, sangre de personas con patologías. Esta enfermedad puede causar malestar general, temperaturas altas, vómitos, ictericias de piel y ojos, entre otros.

Intoxicación por toxina de *Staphylococcus Aureus*: Los alimentos se ven contaminados por esta bacteria gracias a la errónea manipulación del hombre mediante heridas infectadas, secreciones y pus; al entrar en contacto directo con zonas infectadas con *Staphylococcus*, generan una contaminación instantánea

Botulismo generado por *Clostridium Botulinum*: es una intoxicación producida por las esporas de la bacteria que afecta generalmente a alimentos enlatados, embutidos o conservados de manera inapropiada

7.5. Factores intrínsecos y extrínsecos

Según lo mencionado por Valle (2011) existen factores intrínsecos y extrínsecos (**Tabla 4**), y son descritos como:

7.5.1. Factores intrínsecos: Son las características inherentes de los alimentos que afectan su susceptibilidad a la contaminación y las composiciones químicas y físicas de ellos, dentro de estos factores se encuentra: aw, pH, estructura del producto alimentario, nutrientes y potencial de oxidación

aw de ciertos alimentos: Se refiere a la cantidad de agua que dispone el alimento para los microorganismos, de manera que ellos puedan subsistir, estos suelen necesitar niveles mínimos de aw para poder multiplicarse; Por debajo de 0,87, se inhibe el desarrollo de ciertas bacterias y mayoría de levaduras, dando vía a la proliferación de mohos ya que es un ambiente óptimo para ellos. Productos frescos que requieren de refrigeración, necesitan un aw superior a 0,970, determinando de tal forma la corta vida de este tipo de alimentos y alimentos con baja actividad como harinas, azúcares o alimentos deshidratados son menos propensos a contaminarse.

PH o grado de acidez-alcalinidad: Influye en la actividad enzimática y la actividad microbiana ya que la mayoría de bacterias requieren de un pH neutro o ligeramente ácido para crecer; sin embargo, entre más acidez tenga el microorganismo, tiene mayor dificultad para desarrollarse. En el caso de las frutas están más propensas a ser infectadas por mohos y levaduras, mientras que los productos que requieren refrigeración son mayormente afectados por bacterias. El rango de multiplicación bacteriana, en cuanto a pH, comprende bajos potenciales de 4,5 y altos como 9, con un crecimiento óptimo que va desde 6,5 hasta 7,5.

Potencial redox: Es la capacidad que tiene el alimento para aceptar o donar electrones en reacciones químicas, lo cual influye de manera directa en la disponibilidad de oxígeno y otros compuestos para los microorganismos, afectando de tal forma sus metabolismos y retrasando e impidiendo su proliferación

7.5.2. Factores extrínsecos: Son aquellos que afectan al alimento desde el entorno externo al que se encuentra presente el microorganismo, dentro de ellos se encuentra:

Temperatura: La temperatura externa, mayormente regida en los almacenamientos, influye en la velocidad de crecimiento microbiano y se clasifican según temperaturas altas como mesófilo y termófilos y temperatura frías o bajas como psicrófilos y psicrótrofos

Presión: Es aplicada para procesamientos y conservaciones, preservando la calidad del producto al inhibir el crecimiento de microorganismos aerobios que requieren oxígeno para desarrollarse, además, en condiciones controladas se utiliza para procesos experimentales y de conservación regulando la optimización de las condiciones de crecimiento o actividad microbiana. Este factor se dio por investigaciones de Hite en 1899 con los efectos sobre la leche de la alta presión.

Tabla 4. Factores intrínsecos y extrínsecos



Fuente: Nieto (2016).

7.6. Aislamiento microbiano en entornos naturales

Teniendo en cuenta lo dicho por Álvarez et al; Los microorganismos, omnipresentes en la naturaleza en poblaciones puras, requieren de un aislamiento e identificación de cultivos puros que sean completamente viable para su caracterización; este proceso implica la separación específica de un microorganismo y otro en una muestra con base a un procedimiento que conlleva diluciones seriadas o siembra en medios de cultivos, los cuales deben estar en condiciones óptimas y de mantenimiento con el fin de que se mantenga el crecimiento microbiano y se puedan obtener colonias viables y visibles, para mantener sus futuras generaciones. En estas fases se aplican estrategias específicas de aislamiento con base a las condiciones requeridas por el microorganismo posterior a su identificación. Algunos de estos microorganismos se clasifican en:

Microorganismos acuáticos: El agua es vital para los seres vivos; sin embargo, son importantes y críticos en la salud y en los torrentes de agua ya sea dulce o salada, ya que los medios acuáticos son fuentes de transmisión para aquellos microorganismos que residen en el tracto gastrointestinal, en humanos y animales, es decir, microorganismos entéricos. Debido a ello, los tratamientos de agua son críticos y rigurosos, pero a la vez presentan complicaciones debido al desarrollo volitivo bacteriano cultivable y el control de los mismos.

Microorganismos de suelo o tierra: El suelo está compuesto por una mezcla de minerales, que varían según las condiciones geográficas, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos; Estos minerales interactúan entre sí para determinar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo que influyen directamente en la actividad microbiana y desarrollan roles importantes en la salud del suelo, adquisición de nutrientes y crecimiento vegetal.

Microorganismos de aire o ambiente: La atmósfera actúa como vehículo para la dispersión microbiana, el cual ocurre en distintas escalas, se puede presentar desde distancias cortas y llegar a sobrepasar el continente. Esta dispersión puede tener implicaciones significativas en diversas áreas en donde se ve implicada la sanidad humana, animal, vegetal e incluso afecta la economía e influye en la biodiversidad, estructuración y evolución microbiana.

7.7. Cultivos axénicos

Según Tuesta (2014) En la naturaleza, los cultivos axénicos compuestos por solo una especie de microorganismo que es originada por una sola célula son en su mayoría extraños, en entorno naturales acuáticos, terrestres y el cuerpo humano, predominan los cultivos en donde diversas especies coexisten en conjunto, es decir, cultivos mixtos. Sin embargo, bajo condiciones controladas en laboratorio es posible obtener artificialmente cultivos axénicos mediante regulaciones específicas, dado que los microorganismos están omnipresentes en la naturaleza, en las áreas de laboratorio y en toda la instrumentación utilizada. Para tener certeza de la pureza de un cultivo axénico se requiere de la erradicación de estos

microorganismos contaminantes. Para producir un este tipo de cultivos, el paso número dos consiste en agregar una sola célula microbiana en un medio de cultivo de composición líquida o sólida, este procedimiento permite aislar el microorganismo omnipresente y promover su crecimiento bajo condiciones controladas. Un clon se compone de células descendientes de un único microorganismo y una colonia se forma cuando el clon alcanza el tamaño suficiente para visualizarse en el medio en el que ha sido inoculado a nivel superficial. Para asegurar el continuo crecimiento y supervivencia microbiana, después de cierto crecimiento en un tubo, el microorganismo debe ser resembrado en un medio de cultivo; esta fase debe ser crítica y elaborada bajo condiciones específicas y controladas, de manera que no haya exposición a contaminantes ambientales.

Luego de que el cultivo se encuentra completamente puro, al obtenerse se debe conservar y propagar y de esta manera, los investigadores podrán genera más células del cultivo madre y trabajar con ellas. Los medios que se encuentran solidificados se hacen generalmente, agregando agar-agar a los medios líquidos. En los medios naturales como lo es, el agua, suelo o el cuerpo humano, se presenta la existencia de cultivos mixtos. En un cultivo mixto, existen variedades de especies en conjuntas, este tipo de cultivos axénicos se obtienen en laboratorios y se denominan cultivos axénicos o puros por la obtención de un tipo de microorganismo. Los cultivos puros se dan mediante colonias aisladas, lo que certifica que todos los individuos compartan la misma composición genética. Este tipo de cultivo puro son base para el estudio de las características e identificación certera de la variedad de microorganismos. De tal manera, el conocimiento sobre el mundo bacteriano y el funcionamiento de estas comunidades ha aumentado a lo largo del tiempo, lo que ha permitido establecer que este tipo de cultivos se presentan en condiciones no naturales, por ello, la fisiología de un microorganismo en ambiente natral y un microorganismo en cultivos puros suele ser diferente.

7.7.1. Proliferación de cultivos axénicos

Los cultivos puros, como se observa en la figura 51, contienen solo un tipo de microorganismo en el medio de cultivo; el cual se obtiene mediante el aislamiento de colonias, provenientes de una célula en particular. En los laboratorios se pueden obtener

cultivos axénicos de manera artificial. Este cultivo de alta pureza, al obtenerse se deber conservar y propagar y de esta manera, los investigadores podrán genera más células del cultivo madre y trabajar con ellas. Para que en un laboratorio se lleve a cabo un cultivo microbiano, primeramente, se debe preparar un medio de cultivo que puede ser sólido, líquido e incluso semisólido, los cuales deben proporcionar los nutrientes necesarios para un correcto desarrollo del microorganismo en estudio.

Figura 51

Cultivos axénicos



Fuente: Agrotendencia, sf.

7.8. Medios de cultivos químicamente definidos y no definidos

Medios definidos o sintéticos: Según lo afirmado por Gutiérrez y Predique (2008) afirma los medios de cultivo necesitan de una fuente enérgica que les permita impulsar el crecimiento microbiano, dentro de ellos se hace presente el nitrógeno, fósforo, azufre, carbono, los cuales contienen una proliferación orgánica que no es sintetizada por el microorganismo. Por otra parte, donde la composición química que se tiene es conocida, se clasifica como un medio de cultivo que se encuentra químicamente establecido.

Para llevar a cabo la preparación de estos medios de cultivos, se identifica su composición química, ya que deben tener componentes con pureza alta.

Medios de cultivo indefinidos: reciben el nombre de no definido cuando no es certero conocer la composición precisa del medio de cultivo, en este caso se usan medios indefinidos, de sustratos naturales o complejos, entre ellos se encuentra el Agar nutritivo los cuales se preparan en base a una mezcla de nutrientes como extracto de carne, levadura, peptonas,

agar-agar, entre otros. Estos medios de cultivo en particular no contienen una forma química en particular (Gutiérrez y Predique, 2008).

7.9. Medios de cultivos diversos

Tovar (2012) establece que los distintos medios de cultivo se denominan:

Cultivo líquido: Son soluciones acuosas también llamados caldos que contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano. En este tipo de cultivo se transfiere el inóculo mediante una pipeta, un asa bacteriológica a un hisopo, en el cual la proliferación microbiana se detecta por la turbidez presente en el líquido debido al aumento celular, normalmente se presenta mayor crecimiento en las superficies o se distribuye en todo el tubo en forma de sedimento o película. Este tipo de cultivo presenta la ventaja de poder agitarse para incrementar la velocidad de crecimiento de microorganismos anaeróbios, además facilita la estandarización de la concentración del inóculo. Una de sus desventajas es que no se puede determinar un contaminante a simple vista

Medios semisólidos: Son medios de cultivo que se preparan en tubos y presentan una consistencia intermedia entre el sólido y el líquido y están diseñadas para proporcionar un soporte semirrígido que le permite el crecimiento microbiano. Para la utilización de este tipo de medios se realiza una siembra con asas recta o pipeta Pasteur, el cual requiere de una temperatura aproximada de 41 °C antes de agregar el inóculo. Estos medios suelen tener menor cantidad de agente solidificante que les otorga una textura gelatinosa y facilita la movilidad de los microorganismos

Medios sólidos: Son sustancias o matrices físicas generalmente gelificadas que están diseñadas para proporcionar un entorno nutritivo y óptimo, de manera que impulse la proliferación microbiana en condiciones de laboratorio. Estos medios contienen componentes específicos que permiten el crecimiento; primeramente, pasan por un proceso de elaboración según las indicaciones de la casa comercial y posterior a ello, está listo para permitir que los microorganismos se desarrollen en forma de colonias visibles y distintivas, facilitando su observación e identificación a nivel macroscópico.

8. BIBLIOGRAFÍA

Ángeles J. (6 de febrero de 2012). Glucólisis y respiración celular. Slideshare.com
Recuperado de:

https://es.slideshare.net/jesusangeles/gluclisis-y-respiracion-celular?from_action=save

Alarcón, P., González, M. y Castro E. (2016). Rol del microbiota gastrointestinal en la regulación de

la respuesta inmune. Revista Médica de Chile.

https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872016000700013

Álvarez, M., Blandón L., Ceballos V., Mejía M. y Buriticá H. (s.f.) Aislamiento de Microorganismos en diferentes ambientes (Suelo, Agua y Aire). Pg. 1,2.

Arana, I., Maite, O., y Barcina, I. (s.f). Cálculo de los parámetros que definen el crecimiento bacteriano. Departamento Inmunología, Microbiología y Parasitología
Universidad del País Vasco/Euskal

Herriko Unibertsitatea. Recuperado de

https://ocw.ehu.eus/file.php/48/Tema_4._calculo_de_los_parametros_que_definen_el_crecimiento_bacteriano.pdf

Bastardo, Y. y Pedrique, M. (2008). Producción de energía en los microorganismos. Cátedra de Microbiología Facultad de Farmacia - Universidad Central de Venezuela
Recuperado de:

http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_4_Metabolismo.pdf

Berg J. M. Tymoczko J. M., y Stryer L. (2007). Bioquímica sexta edición (p. 521).

Barcelona-España. Editorial Reverté. Recuperado de:

<https://books.google.com.co/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA521&lpg=PA521&dq=fuerza+pr>

[oton+motriz&source=bl&ots=LVyFE7Bpgy&sig=ACfU3U0KG240z19Mzhu-MscolhztJDjtjg&hl=es-](https://books.google.com.co/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA521&lpg=PA521&dq=fuerza+proton+motriz&source=bl&ots=LVyFE7Bpgy&sig=ACfU3U0KG240z19Mzhu-MscolhztJDjtjg&hl=es-)

[419&sa=X&ved=2ahUKEwj7256c7f_pAhUtWN8KHZ6ND-](https://books.google.com.co/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA521&lpg=PA521&dq=fuerza+proton+motriz&source=bl&ots=LVyFE7Bpgy&sig=ACfU3U0KG240z19Mzhu-MscolhztJDjtjg&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwj7256c7f_pAhUtWN8KHZ6ND-0Q6AEwFnoECAoQAQ#v=onepage&q=fuerza%20proton%20motriz&f=false)

[0Q6AEwFnoECAoQAQ#v=onepage&q=fuerza%20proton%20motriz&f=false](https://books.google.com.co/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA521&lpg=PA521&dq=fuerza+proton+motriz&source=bl&ots=LVyFE7Bpgy&sig=ACfU3U0KG240z19Mzhu-MscolhztJDjtjg&hl=es-0Q6AEwFnoECAoQAQ#v=onepage&q=fuerza%20proton%20motriz&f=false)

Cabrera. (2017). La fermentación alcohólica. Recuperado el 7 de junio del 2020, Química general y laboratorio: <http://cabreramorenodj.blogspot.com/2017/02/la-fermentacion-alcoholica.html>

Cardellá R. L. (2007). Bioquímica Humana (pg. 116-123). La Habana: Editorial Ciencias Médicas. Recuperado de https://www.academia.edu/27192764/Bioquimica_Humana_1ed_Cardell%C3%A1.pdf

Cardellá R. L. (2007). Bioquímica Humana (pg.109-115). La Habana: Editorial Ciencias Médicas.

Recuperado de:

https://www.academia.edu/27192764/Bioquimica_Humana_1ed_Cardell%C3%A1.pdf

Carrillo, U. (25 de octubre 2014). Interacciones microbianas. Slideshare. Recuperado de <https://es.slideshare.net/urielcarrilloarroyo/interacciones-microbianas>

Cervantes, J., Orihuela, R., y Rutiaga, J. (26 noviembre 2017). Acerca del Desarrollo y Control de Microorganismos en la Fabricación de Papel. Instituto Tecnológico de Aguascalientes. Recuperado de <https://www.redalyc.org/jatsRepo/944/94454631001/html/index.html>

CEUPE (2020), Desarrollo microbiano. [Blog] Recuperado de <https://www.ceupe.com/blog/desarrollo-microbiano.html>

Cnx Bio (22 de marzo 2018). División celular en procariontes. Recuperado de <https://cnx.org/contents/Kg1WOo7r@6/Divisi%C3%B3n-celular-en-procariontes>

Cuenca, B. (20 de mayo de 2016). Nutrición celular.Slideshare.com. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/BenitoCuenca/nutricin-celular-62216816>

Fields, D. (2019). ¿Cuáles son los organelos? News medical lifesciences. Recuperado de: [https://www.news-medical.net/life-sciences/What-Are-Organelles-\(Spanish\).asp](https://www.news-medical.net/life-sciences/What-Are-Organelles-(Spanish).asp)

Gonzales, A. (2013). División celular. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. Recuperado de: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema9/9-2mitosis.htm>

Guerrero R. y Berlanga M. (2009). La evolución y la microbiología (p. 105). AMBIOCIENCIAS. Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona. Recuperado de: <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/2458/P%C3%A1ginas%20desde%20Darwin-1-16.pdf?sequence=1>

Gutiérrez, S. y Predique, M. (2008). Cultivo de microorganismos. Recuperado de:
http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_5_Cultivo.pdf

Guzmán, B. y Nava, G. (octubre 2015). Enfermedades Vehiculizadas por Agua-EVA e Índice de Riesgo de la Calidad-IRCA. Recuperado de:
<https://www.ins.gov.co/sivicap/Documentacion%20SIVICAP/2015%20Enfermedades%20Vehiculizadas%20por%20Agua%202014.pdf>

Harvey, R. A. (2013). Fisiología (p. 12). thePoint. Barcelona-España.
Recuperado de:
<https://elibro.net/es/ereader/biblioupc/125896>

Iáñez, E. (1998). Crecimiento a nivel de poblaciones. Universidad Nacional del Nordeste.
Recuperado de http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/14_micro.htm

Lago, V. B. (2018). Crecimiento bacteriano. Universidad de Oviedo. Recuperado de
<https://www.studocu.com/es/document/universidad-de-oviedo/microbiologia/apuntes/crecimiento-bacteriano/2708222/view>

López, I. (2020). Microbioma humano: un universo en nuestro interior. SE BBM.
Recuperado de:
<https://www.sebbm.es/revista/articulo.php?id=500&url=microbioma-humano-un-universo-en-nuestro-interior>

López, I. (7 de octubre 2016). LUCA: el último ancestro común universal. microBIO.
Recuperado de:
<https://microbioun.blogspot.com/2016/10/luca-el-ultimo-ancestro-comun-universal.html>

Madigan, M. et. al (2015). Brock. Biología de los microorganismos. (14a ed.) Pearson Educación. Tomado de <http://www.ebooks7-24.com/?il=5285>

Méndez A. (2011). Fermentación alcohólica. Recuperado el 7 de junio del 2020, La guía química:
<https://quimica.laguia2000.com/general/fermentacion-alcoholica>

Montenegro, F. J. (14 de enero de 2015). Nutrición bacteriana. Slideshare.com
Recuperado de:
<https://es.slideshare.net/henrick91/nutricion-bacteriana-43531575>

Organización Mundial de la Salud. (s.f). Agua, saneamiento e higiene.
Recuperado de:
https://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diseasefact/es/

- Peña, K. (2017). El hábitat de los microbios. Revista. Recuperado de:
https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_2/PDF/HabitatMicrobios.pdf
- Raffino M.E. (2020). Respiración anaerobia. Concepto.de. Argentina.
 Recuperado de:
<https://concepto.de/respiracion-anaerobia/>
- Rivas C. (13 de diciembre de 2015). Tema 10. Microbiología, apuntes de microbiología. Docsity.com.
 Recuperado de: <https://www.docsity.com/es/tema-10-microbiologia-5/3260876/#:~:text=La%20torre%20de%20electrones.,y%20los%20m%C3%A1s%20positivos%20abajo>
- Serna A. Instituto tecnológico de Sonora (2009). Compuestos de alta energía. Slideshare.com Recuperado de: <https://es.slideshare.net/tango67/compuestos-de-alta-energa>
- Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., y Painter, P. (1992). Microbiología. Biosíntesis de peptidoglicano. (p. 151). Barcelona-España Editorial Reverté, S. A. Recuperado de
<https://books.google.com.co/books?id=2u-6Q2XCMDgC&pg=PA151&lpg=PA151&dq=bios%C3%ADntesis+de+peptidoglicano&source=bl&ots=4VmfrbvIMr&sig=ACfU3U2qDK0LGbkyb7aDhUa8S-rOZVWRRw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj55SYzPPpAhW0SjABHVQmBscQ6AEwF3oECAo>
[QAQ#v=onepage&q=bios%C3%ADntesis%20de%20peptidoglicano&f=false](https://books.google.com.co/books?id=2u-6Q2XCMDgC&pg=PA151&lpg=PA151&dq=bios%C3%ADntesis+de+peptidoglicano&source=bl&ots=4VmfrbvIMr&sig=ACfU3U2qDK0LGbkyb7aDhUa8S-rOZVWRRw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj55SYzPPpAhW0SjABHVQmBscQ6AEwF3oECAo)
- Tesauro, A. (2013). Islas de patogenicidad. Boletín agrario. Recuperado de:
<https://boletinagrario.com/ap-6,islasm+de+patogenicidad,3039.html>
- Totora., Funke y Case (2007). Introducción a la microbiología. (p.144). (9a ed.). Buenos aires: Editorial Medica panamericana. Recuperado de:
<https://books.google.com.co/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA144&dq=diversidad+metabolica&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjd5OfjqfXpAhXxct8KHaQLDQE6AEIJzAA#v=onepage&q=diversidad%20metabolica&f=false>
- Tovar, C. (26 de septiembre de 2012). Técnicas básicas para el cultivo de microorganismos: siembra y

- estudio de bacterias. Recuperado de:
<https://conalepfelixtovar.wordpress.com/2012/09/26/tecnicas-y-metodos-de-aislamiento-y-seleccion-de-microorganismos/>
- Tuesta, H. (2014). Cultivo axénico. SCRIBD. Recuperdo de
<https://es.scribd.com/doc/110903216/Cultivo-axenico>
- Valenzuela, G. (3 de diciembre 2009). Fisiología microbiana. Slideshare. Recuperado de:
<https://es.slideshare.net/gabrielapazita/fisiologa-microbiana>
- Voet, D. y Voet, J. (2006). Bioquímica (pg. 829 – 856). Buenos aires-Argentina. Editorial Médica Panamericana S.A. Recuperado de:
https://books.google.com.co/books?id=r5bedH_aST0C&pg=PA829&dq=Fosforilaci%C3%B3n+oxidativa+o+cadena+de+transporte+de+electrones&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjIv ezWq4LqAhX DI-AKHXgCBDoQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Fosforilaci%C3%B3n%20oxidativa%20o%20cadena%20de%20transporte%20de%20electrones&f=false

Referencias de las figuras

- Anmat (s.f.) Factores ambientales y crecimiento microbiano. [Figura]
<https://mascapitacioncrudosymarinados.wordpress.com/factores-que-influyen-en-la-supervivencia-y-crecimiento-de-microorganismos-en-los-alimentos/>
- Agrotendencia (s.f.). Cultivos axénico.[Figura] Recuperado de:
<https://agrotendencia.tv/agropedia/glosario/axenico/>
- Agundez, L. (2009). Aparato de Golgi y lisosoma. [Figura] Recuperado de:
<http://luisangelagundezgavarain.blogspot.com/2009/>
- Álvarez, F. (2013). Transmisión de enfermedades por alimentos. [Figura]
 Recuperado de:
<https://prezi.com/ozxjwl9uqq9o/los-alimentos-como-vehiculos-de-transmicion-de-enfermedades/>
- Bastardo y Pedrique (2008). Respiración aerobia. [Figura] Recuperado de:
http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_4_Metabolismo.pdf
- Bastardo y Pedrique (2008). Respiración anaerobia. [Figura] Recuperado de:
http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_4_Metabolismo.pdf

- Benito, P. (25 de junio de 2015). Población microbiana. [Figura] Recuperado de: <http://urbinavinos.blogspot.com/2015/06/recuento-de-levaduras-brettanomyces-en.html>
- Cabello, C. (2015). Nutrición celular. [Figura] Recuperado de: <https://slideplayer.es/slide/4123558/>
- CSIC (2015). Microbiota en el cuerpo humano. [Figura] Recuperado de <https://twitter.com/csic/status/677832514115928064>
- Echevarría, C. y Casanova, W. (2018). Enfermedades transmitidas por el agua. [Figura] Recuperado de <https://mx.blastingnews.com/salud-belleza/2018/05/agua-contaminada-oms-la-salud-en-riesgo-para-dos-mil-millones-de-personas-002555005.html>
- Eurecat (s.f.). Microbiota del estómago. [Figura] Recuperado de: <https://eurecat.org/es/portfolio-items/microbiota/>
- Echevarría, C. y Casanova, W. (2018). Enfermedades transmitidas por el agua. [Figura] Recuperado de <https://mx.blastingnews.com/salud-belleza/2018/05/agua-contaminada-oms-la-salud-en-riesgo-para-dos-mil-millones-de-personas-002555005.html>
- García, Q. (2014). Nutrición bacteriana. [Figura] Recuperado de: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/nutricion-bacteriana.html>
- García, S. (2013). Fisión binaria. [Figura] Recuperado de http://investiciencias.com/index.php?option=com_content&view=article&id=22&Itemid=26
- Gonzales, A. (2007). Ciclo de Krebs. [Figura] Recuperado de: <http://www.biologia.edu.ar/metabolismo/met3glicolisis.htm>
- Gonzales, A. y Raisman, J. (2005). Glucólisis. [Figura] Recuperado de: <http://www.biologia.edu.ar/metabolismo/met3glicolisis.htm>
- Gonzales, A. (2002). Diagrama tridimensional del RE. [Figura] Recuperado de: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema9/9-1nucleo.htm>
- Gonzales, A. (2013). Citogénesis. [Figura] <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema9/9-2mitosis.htm>
- Gonzales, A. (2013). Mitosis. [Figura] Recuperado de <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema9/9-2mitosis.htm>

- Gonzales, A. (2013). Núcleo. [Figura] Recuperado de:
<http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema9/9-1nucleo.htm>
- Gutiérrez, F. (2014). Microbiota de la piel. [Figura] Recuperado de:
<https://es.slideshare.net/salazarfrg/infecciones-virales-y-bacterianas-de-la-piel>
- Hoyos, A. (2012). Torre de electrones. [Figura] Recuperado de:
<https://es.slideshare.net/Pr1nc3zs/04-metabolismo-mg-08-09>
- Moreno, C. (2015). Adenosina trifosfato. [Figura]
Recuperado de:
<http://agustoamador.blogspot.com/2015/03/atp-molecula-de-energia.html>
- Oviedo, A. (2016). Membrana plasmática. [Figura] Recuperado de:
<https://sites.google.com/site/arianny2016biologia/bienvenidos/membrana-celular-y-potencial-celular>
- Pacios, S., Rodríguez R., Flores A., Chávez, M., Ramos, R., Segura, E., y Ilina, A. (2019). Enfermedades transmitidas por alimentos. [Figura] Recuperado de:
<http://www.cienciacierta.uadec.mx/2019/01/10/alternativas-para-el-control-de-bacterias-transmitidas-por-alimentos/>
- Rye, C., Wise, R., Jurukovski, V., DeSaix, J., Choi, J., & Avissar, Y. (2016). 4.3
Eukaryotic cell. [Figura] Recuperado de:
<https://openstax.org/books/biology/pages/4-3-eukaryotic-cells#fig-ch04-03-06>
- Roca, A. (2020). Proteína Fts y proteínas Mreb. [Figura] Recuperado de
<https://www.docsity.com/es/citoesqueleto-y-sus-partes/5315176/>
- Rojas, E. (2015). Biosíntesis de peptidoglucano. [Figura] Recuperado de
<https://www.slideshare.net/emmanuelrojas925/microbiologia-56254457>

Referencias de tablas

Alarcón et al; (2016). Evolución de la denominación de las comunidades de microorganismos. [Tabla].

Recuperado de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872016000700013

Nieto, J. (2016). Factores intrínsecos y extrínsecos. [Tabla] Recuperado de:

<https://docplayer.es/12642782-Fisiologia-y-cinetica-microbiana-dra-maribel-plascencia-jatomea.html>

Referencia de las gráficas

García, Q. (30 de octubre 2014). Fases de la curva de crecimiento. [Gráfica] Recuperado de <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/curva-del-crecimiento.html>

ANEXOS

1. BIOSEGURIDAD Y USO CORRECTO DE NORMAS E IMPLEMENTOS DE LABORATORIO

OBJETIVOS

- Conocer la importancia de aplicar las normas de bioseguridad dentro de un laboratorio
- Conocer las normas de seguridad de un laboratorio
- Crear conciencia para la prevención de accidentes en el laboratorio
- Conocer todos los implementos del laboratorio

Semestre: IV

*Código asignatura
MB203*

*Asignatura
Fisiología microbiana*

INTRODUCCIÓN

Bioseguridad

La bioseguridad es el conjunto integral de medidas y prácticas destinadas a prevenir riesgos ante una exposición y manejo de agentes biológicos que podrían representar un riesgo para la salud humana, animal y medioambiental; esta se rige bajo normas y procedimientos que incluye prácticas, contenciones físicas, biológicas y químicas que son respaldados bajo niveles de bioseguridad específicos según el área de trabajo.

Los contaminantes biológicos activos, conocidos como agentes microbianos forman un grupo extenso de organismos que viven como células aisladas; dentro de esta amplia gama de contaminantes se incluyen diversas familias microbianas, entre ellos se encuentran bacterias, hongos, virus y protozoos

Las sustancias químicas son componentes importantes con una composición definida formada por átomos, que se unen para formar moléculas y estructuras complejas, cada sustancia química exhibe propiedades únicas que define su comportamiento físico y químico

en diversas aplicaciones. Ellas se distinguen una de otras porque adoptan una precisión específica dividida en sólidos, líquidos y gaseosos, en el estado sólido tiene una estructura compacta y ordenada, el líquido influyen y toman la forma del recipiente y el gaseoso se esparce en partículas libremente. Bajo estas propiedades adquieren distintas condiciones de presión y temperatura.

Las sustancias pueden dividirse en dos categorías principales, por un lado, están las sustancias simples quienes se encuentran formadas por átomos de un solo tipo de elemento y por otro lado se encuentran las sustancias compuestas que consisten en átomos de dos o más elementos diferenciales. Ambas sustancias presentan 3 cambios los cuales son:

- Físicos: No implican una transformación química, solo alteran la forma o el estado de la sustancia como comprimir un gas o romper un sólido
- Fisicoquímicos: no conlleva una transformación química, si no únicamente cambios en el estado de agregación como la transición de un líquido a un gas
- Químicos: Lleva a cabo la formación de sustancias nuevas a partir de la reordenación de átomos en diferentes combinaciones

Consideradas fuentes riesgosas para la salud pública y el medio ambiente, los residuos peligrosos son originados a partir de desechos provenientes de las actividades del hombre, agricultura, industrias, labores domésticas, entre otros. Por ello, diversas entidades han trabajado en resoluciones y decretos que instruyan con base a esta problemática; el Decreto 4741 del año 2005, posteriormente unificado en 2015 en el Título 6 del Decreto 1076, otorga definiciones sobre los residuos peligrosos catalogarlos como aquellos que causan riesgos y efectos adversos en la salud de los seres vivos y afectan las actividades medioambientales; esto se debe a sus características tóxicas, inflamables, corrosivas y dañinas resaltando no solo la sustancia tóxica como tal, sino los envases, frascos o cualquier tipo de material que estuvo en contacto con ellos.

En cuanto al manejo de los residuos peligrosos (aprovechamiento externo, tratamiento externo, y disposición final interna y externa); el tratamiento externo de residuos o desechos peligrosos, especialmente a través de la incineración, continúa siendo la forma de manejo

más utilizada por los generadores para los residuos peligrosos generados, seguida por la disposición final (interna y externa) de estos residuos y por último su aprovechamiento y/o valorización externa.

Normas de bioseguridad

Las normas en el laboratorio son generales y estandarizadas para todos en el uso correcto del mismo. Cada norma es de interés general y explicativo para todos los que usemos el laboratorio; para el uso correcto debemos seguir las siguientes reglas: Según Prieto Blanco (1 983): “Un comportamiento irresponsable puede ser motivo de expulsión inmediata del laboratorio y de sanción académica”. Esto nos quiere decir que el laboratorio es algo necesario para adquirir sabiduría por lo mismo uno debe tener el comportamiento adecuado para evitar la expulsión y sanción por parte del profesor a cargo.

Normas generales

- No fumes, comas o bebas en el laboratorio.
- Utiliza una bata y tenla siempre bien abrochada, así protegerás tu ropa.
- Guarda tus prendas de abrigo y los objetos personales ¹en un armario o taquilla y no los dejes nunca sobre la mesa de trabajo.
- No llesves bufandas, pañuelos largos ni prendas u objetos que dificulten tu movilidad.
- Procura no andar de un lado para otro sin motivo y, sobre todo, no corras dentro del laboratorio.
- Si tienes el cabello largo, recógetelo.
- Dispón sobre la mesa sólo los libros y cuadernos que sean necesarios. ¹Ten siempre tus manos limpias y secas. Si tienes alguna herida, tápala.

- En caso de producirse un accidente, quemadura o lesión, comunícalo inmediatamente al profesor. Recuerda dónde está situado el botiquín.
- Mantén el área de trabajo limpia y ordenada.

Normas referentes a la Instalación

- Los espacios cuentan con instalaciones amplias y fáciles de usar; en el caso de situaciones críticas como abundante humo o incendios, se debe abrir cuidadosamente
- Los suelos deben ser en su mayoría antideslizante, mesas y asientos en buen estado, que permitan trabajar de forma segura
- Los desagües deben estar en buen estado y son especiales para las sustancias que se usan con frecuencia en el área
- Las ventanas y puertas han de abrir adecuadamente, ya que en caso de humos excesivos es necesaria la máxima ventilación y en caso de incendio, la mínima
- Los conectores deben estar en buen estado y clasificados según su potencia de energía, además, todos deben ir en partes superiores para evitar accidentes
- Se debe tener lugares de almacenamiento específico para cada implemento utilizado dentro del laboratorio

Normas personales

- El trabajo es dividido por equipos y cada uno se hace responsable de los informes y materiales necesitados

- La bata es el instrumento primordial a la hora de entrar al laboratorio, utilizada como modo de bioseguridad
- Los accesorios en el cabello están prohibidos, de la misma manera, el cabello debe estar recogido y en lo posible protegidos (se recomienda usar gorros)
- Está prohibida la ingesta de bebidas, alimentos y sustancias nocivas

Normas referentes al orden

- Se debe tener una zona específica de un armario o gavetero con llave para guardar las sustancias tóxicas
- El orden dentro del laboratorio debe ser primordial, así como todos los implementos deben ser lavados y esterilizados
- Los mesones de laboratorio deben estar completamente libres, evitando cualquier tipo de contaminación

Normas referentes a la utilización de productos químicos

- Se debe tener muy claro el compuesto a utilizar, por ello se revisa su ficha de instrucciones y recomendaciones
- Los productos químicos no deben ser tomados, el docente a cargo se encargará de suministrarlos
- Se debe consultar al docente si sobró producto, de manera que él proporcionará las indicaciones pertinentes
-

Normas para manipular instrumentos y productos

- Todos los productos inflamables deben almacenarse en un lugar adecuado y separados de los ácidos, las bases y los reactivos oxidantes.
- Los ácidos y las bases fuertes han de manejarse con mucha precaución, ya que la mayoría son corrosivos y, si caen sobre la piel o la ropa, pueden producir heridas y quemaduras importantes.
- Si tienes que mezclar algún ácido (por ejemplo, ácido sulfúrico) con agua, añade el ácido sobre el agua, nunca, al contrario, pues el ácido «saltaría» y podría provocarte quemaduras en la cara y los ojos.
- No dejes destapados los frascos ni aspire su contenido. Muchas sustancias líquidas (alcohol, éter, cloroformo, amoníaco...) emiten vapores tóxicos.

Afiches y señalización

Leer los afiches que se encuentran colocados en los muros del laboratorio, que indican las medidas generales muy importantes de precaución para la manipulación de sustancias peligrosas, en su mayoría reactivos.

RECURSOS REQUERIDOS

Implementos de Bioseguridad

Gorro

Guantes

Tapabocas

Bata manga larga

Materiales y reactivos

Agitador
Embudo de decantación

Bureta

Matraz

Matraz de Erlenmeyer
Pipeta

Tubo de ensayo

Placa de Petri
Varilla de vidrio

Vaso de precipitado

Vidrio de reloj

Probeta

Equipos

Estufa

Balanza

Gramera

Autoclave
Incubadora

Microscopio

METODOLOGÍA

Bioseguridad

Se realizará un foro temático sobre las normas de bioseguridad.

El docente será el moderador encargado de presentar el tema, regular las intervenciones de los participantes y estimular la discusión con preguntas.

Todos los estudiantes participaran en la discusión aportando sus puntos de vista y dialogar respetuosamente con las distintas perspectivas.

Implementos de laboratorio.

En esta sección del informe se explicará la función de los implementos de laboratorio según su clasificación.

Material	Función	Tipo de material
<p>Embudo de vidrio</p> 	<p>El embudo es un instrumento empleado para canalizar líquidos y materiales sólidos granulares en recipientes con bocas estrechas.</p>	<p>puede ser de plástico o vidrio</p>
<p>Vaso precipitado</p> 	<p>Un vaso de precipitados o vaso de precipitado es un recipiente cilíndrico de vidrio fino que se utiliza muy comúnmente en el laboratorio, sobre todo, para preparar o calentar sustancias y traspasar líquidos</p>	<p>Generalmente de vidrio, pero también hay de plástico y metal.</p>

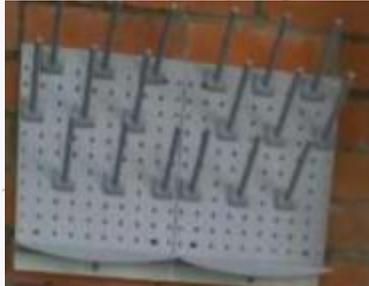
<p>Matraz aforado</p> 	<p>Es un recipiente de vidrio que se utiliza sobre todo para contener y medir líquidos. Se emplean en operaciones de análisis químico cuantitativo, para preparar soluciones de concentraciones definidas</p>	<p>Vidrio</p>
<p>Probeta</p> 	<p>Es un instrumento volumétrico, que permite medir volúmenes considerables con un ligero grado de inexactitud. Sirve para contener líquidos</p>	<p>Generalmente vidrio, pero también hay plástico y metal.</p>
<p>Pipeta</p> 	<p>Es un instrumento volumétrico de laboratorio que permite medir la alícuota de líquido con bastante precisión.</p>	<p>Material de vidrio</p>

<p>Matraz</p> 	<p>Recipiente de cristal donde se mezclan las soluciones químicas, generalmente de forma esférica y con un cuello recto y estrecho, que se usa para contener líquidos; se usa en los laboratorios.</p>	<p>Material de vidrio</p>
<p>Mortero de pilón</p> 	<p>Se usa para moler o reducir el tamaño de las sustancias.</p>	<p>Porcelana o vidrio</p>
<p>Gradilla</p> 	<p>Utilizada para sostener y almacenar gran cantidad de tubos de ensayo de distintos diámetros</p>	<p>Madera, plástico y metal</p>

IMPLEMENTOS EN LOS LABORATORIOS DE MICROBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR

Escurreidor

Aquí se colocan los recipientes de vidrio para que se sequen



Estufa

Calentar



soluciones, agares, etc....

Lava ojos

Como su nombre lo indica sirve para lavarse los ojos en caso de salpicadura de alguna sustancia



Gramera

Sirve para pesar cantidades pequeñas y exactas de reactivos



Balanza

La balanza es un instrumento que sirve



Incubadora

Sirve para mantener y hacer crecer cultivos



para medir la masa de los objetos

microbiológicos cultivos celulares, regulando factores de crecimiento viables como ejemplo temperatura, humedad y ventilación.

Nevera

Su función consiste en mantener, en un ambiente controlado (espacio refrigerado) diversos fluidos y sustancias, para que los mismos se conserven en buenas condiciones.



Autoclave

Una autoclave de laboratorio es un dispositivo que sirve para esterilizar material de laboratorio, utilizando vapor de agua a alta presión y temperatura, evitando con las altas presiones que el agua llegue a ebullición a pesar de su alta temperatura.



Botiquín

Elemento destinado a contener los medicamentos y utensilios



Lavabo

Se utiliza para el lavado de manos



<p>indispensables para brindar los primeros auxilios en caso de algún accidente de laboratorio.</p>	<p>después de cada práctica de laboratorio.</p>
<p>Mesones impermeables de fácil limpieza</p> 	<p>Cestas de clasificación de residuos</p> 
<p>Extintor</p> 	

EVALUACIÓN

Elaboración de un informe de laboratorio

BIBLIOGRAFÍAS

Colmenares Santoy. (2014) material de laboratorio. Recuperado de:
http://www.edu.xunta.gal/eduga/sites/site.eduga/files/adjuntos/revista/equipo_ouvelas_presentacion_material_laboratorio.pdf

López Reyes. (2016) Guía de materiales de laboratorio. Recuperado de
http://biblioteca.duoc.cl/bdigital/Documentos_Digitales/600/610/39593.pdf

Paricahua Ito. (2016) bioseguridad en el laboratorio recuperado de <http://www.monografias.com/trabajos87/bioseguridad-laboratorio/bioseguridad-laboratorio.shtml>

2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS BACTERIAS

Objetivo general

Reconocer las características de cultivo bacteriano mediante la realización de técnicas de siembra y a la observación de criterios macroscópicos y microscópicos establecidos facilitando una posible identificación.

Objetivos específicos:

- Practicar siembras en medios de cultivos líquidos y sólidos.
- Reconocer las características macroscópicas de las colonias bacterianas.
- Identificar la morfología microscópica teniendo en cuenta la tinción, forma y agrupación.

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura</i> <i>MB203</i>	<i>Asignatura</i> <i>Fisiología microbiana</i>
---------------------	--	---

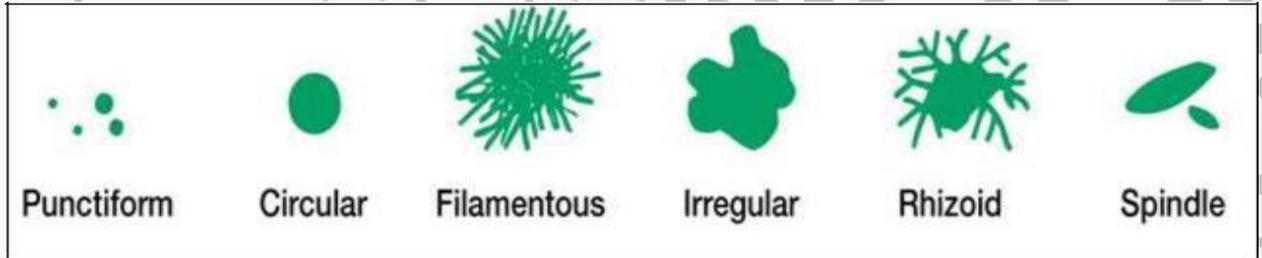
INTRODUCCIÓN

La interpretación de los cultivos bacterianos requiere de una evaluación del desarrollo de las colonias en criterios como:

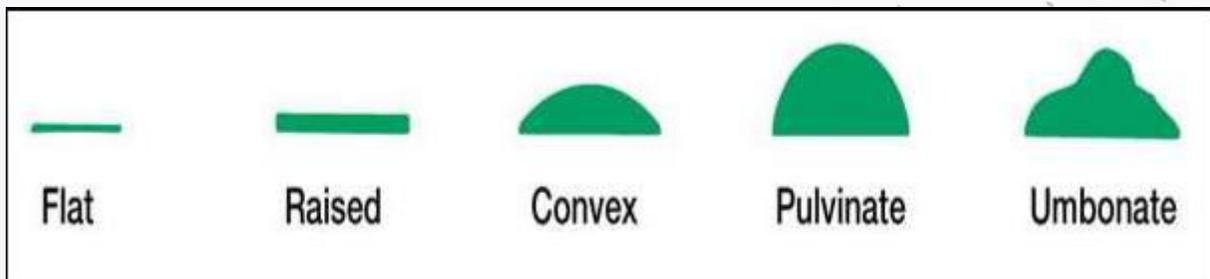
- Observación de las características y cantidad relativa de cada tipo de colonia aislada en agar.
- Determinación de la pureza, reacción de Gram y morfología de las bacterias de cada tipo de colonias.
- Observación de los cambios que rodean a las colonias, ya que reflejan la actividad metabólica de las colonias aisladas

Características macroscópicas de la colonia aislada en medio sólido (Agar)

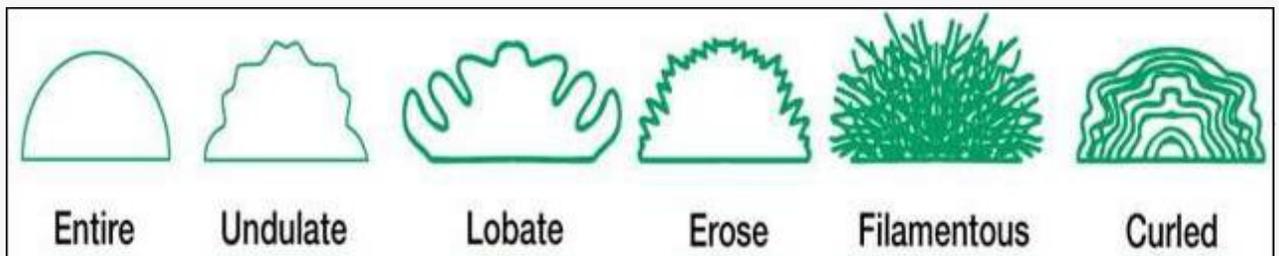
Forma de crecimiento



Elevación de la colonia



Características de los bordes



Consistencia de la colonia: blanda, dura, mucoide

Pigmentación: color de la colonia: pigmentadas (rojos, amarillo, verde, pardo, violeta, etc.) y no pigmentadas.

Tamaño: grande, mediano, pequeño, puntiformes

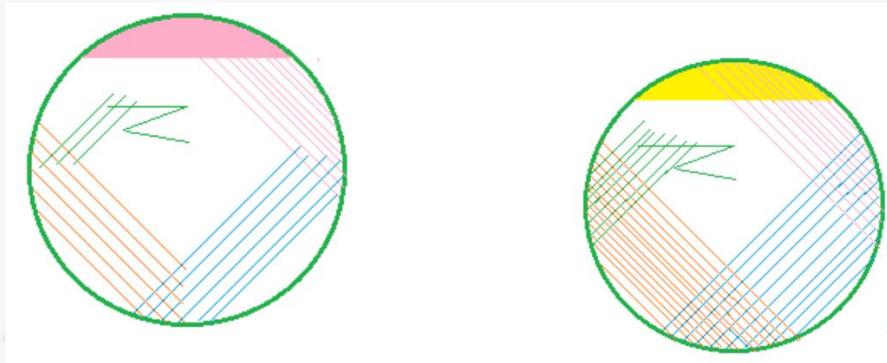
Brillo: si la colonia es brillante u opa

Características macroscópicas en medio líquido (caldo)



Tipos de siembras

En medio sólido (Caja de Petri)



Siembra por agotamiento

Siembra masiva

En tubos de ensayo (medios solidos)



Morfología microscópica

Está constituida por la forma, agrupación y la tinción.

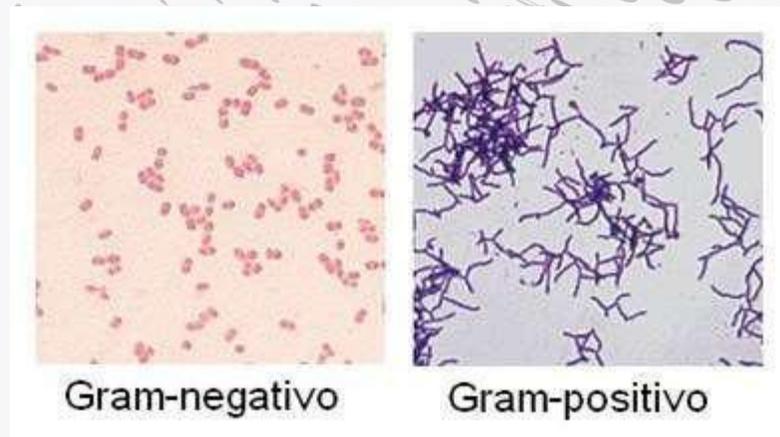


- Bacilos: Ovalado, cilíndrico o en forma de bastón. Varían mucho en longitud y grosor.
- Cocobacilos: Bacilos cortos
- Espirilos: Bacilo curvo en forma de coma, espiral o helicoidal.
- Filamentosa: En forma de hilos entrecruzados.
- Tipos de agrupación
- Los cocos pueden presentar diferentes tipos de agrupación
 - Diplococos: cocos que se dividen en un plano y permanecen unidos en pareja.
 - Estreptococos: Cocos que se dividen en planos paralelos y quedan unidos para formar cadenas.
 - Tétradas: Cocos que se fraccionan en dos planos perpendiculares y conforman equipos de cuatro
 - Sarcinas: Cocos que se dividen en tres planos perpendiculares, formando agrupaciones cuboides.
 - Estafilococos: Cocos que se dividen en tres planos irregulares formando racimos.

Los bacilos no se agrupan como los cocos, pero a veces se presentan en pares o en cadenas, estos tipos de agrupaciones no son características, sino que se deben a la etapa de desarrollo o las condiciones del cultivo.

Tinción

Según su reacción a la tinción con cristal violeta (Gram) se clasifica en dos grupos: los que se colorean, Gram Positivas y los que no se colorean, Gram Negativas.



RECURSOS REQUERIDOS

Implementos de Bioseguridad

- Gorro
- Guantes
- Tapaboca
- Bata manga larga

Materiales y reactivos

- Cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spp*, *Klebsiella Pneumoniae*.
- Tubos con caldo nutritivo

- Cajas de agar nutritivo
- Asas bacteriológicas: rectas y en argolla
- Láminas portaobjetos.
- Batería de coloración de Gram
- Gradilla de coloración
- Aceite de inmersión

Equipos

- Microscopio
- Mechero



METODOLOGÍA

Primer día

1. Se practicará siembra en medios sólidos realizando técnicas por agotamiento. Masiva, por punción, estría y mixta en los medios de cultivo – además se practicará la siembra en medios líquidos.
2. Incubar los cultivos sembrados a 37⁰ C por 24 horas.

Día segundo

3. Se realizará lectura de los medios de cultivos sembrados el día anterior verificando el crecimiento de los microorganismos de acuerdo a la técnica de siembra aplicada.
4. Se realizará descripción macroscópica y microscópica de los cultivos en los cuales se llevó a cabo una siembra mediante la técnica de estrías por agotamiento

EVALUACIÓN

Desarrollar la guía de laboratorio

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Introducción a la microbiología. (2017). 12th ed. Gerard J. Tortora / Berdell R. Funke / Christine L. Case.

Society for General Microbiology, “About microbiology”, Microbiology Online.

Disponible en:. Consultado el 4 de septiembre de 2015.

Tangarife V. Cladophialophora spp. Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. 2011.

Vandepitter, J, Verhaegen, J., Enbaek, K, Rohner, P., Piot, P. & Heuck C.C (2003).

Basic laboratory precedures in clinical bacteriology (2da ed.). World Health

Organization Geneva. Recuperado de: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/42696>

Woolverton, C., Willey, J., Sherwood, L., Klein, D., Harley, J. and Prescott, L.

(2013). *Prescott, Harvey y Klein Microbiología, séptima edición*. Madrid:

McGraw-Hill Interamericana de España.

3. PREPARACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS, RECuento EN PLACA, NÚMERO MÁS PROBABLE Y TÉCNICA DE SIEMBRAS

Objetivo general

Aplicar métodos utilizados para medir el crecimiento microbiano en una muestra de queso para la posterior identificación de microorganismos totales y fecales.

Objetivos específicos

- Realizar diluciones seriadas a partir de la muestra de queso, para obtener un cultivo de microorganismos menos concentrados.
- Desarrollar técnicas comunes siembras en superficie y en profundidad para observar el crecimiento después de tener un periodo de incubación aproximadamente de 24 horas.
- Diferenciar los organismos coliformes totales de los microorganismos coliformes fecales.
- Familiarizarse con los métodos de medición de crecimiento microbiano, especialmente con el de Número Más Probable (NMP).

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura</i> <i>MB203</i>	<i>Asignatura</i> <i>Fisiología microbiana</i>
---------------------	--	---

INTRODUCCIÓN

El conteo microbiano señala la magnitud de la población total bacteriana presentes ya sea en un alimento. En ese sentido se puede determinar por diversas técnicas que se basan en algunos tipos de medición del crecimiento microbiano, resaltando ciertos conceptos que son precisos conocer:

- **Recuento en placa:** Consiste en el plaqueo de una muestra de volumen conocido del alimento que se analiza. El resultado es función de una serie de factores como son el método de muestreo, el tipo de microorganismo, el tipo de alimento y las características del medio de cultivo. Los cultivos pueden hacerse tanto en profundidad como en superficie. Cada bacteria viable formará una colonia, el plaqueo puede hacerse en una placa normal o por medio de diluciones seriadas para depositar concentraciones progresivamente más diluidas de la muestra (Merck, 1994).
- **Siembra en superficie:** Se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido, se deja solidificar y se coloca sobre la superficie el inóculo. Con ayuda de una espátula de Drigalsky se extiende el inóculo. Este tipo de siembra permite observar las reacciones enzimáticas con base a los componentes del medio y se recomienda para microorganismos aerobios estrictos (Madigan, 2003).
- **Siembra en profundidad:** Se coloca el inóculo en una placa o caja de Petri y sobre el mismo se vierte el medio de cultivo previamente fundido. Este método se utiliza para el conteo de microorganismos aerobios (Madigan, 2003).
- **Método del número más probable (NMP):** Es una técnica de estimación estadística basada en el hecho que, a mayor número de bacterias en una muestra, mayor será la dilución necesitada para reducir la densidad hasta el punto en que ninguna bacteria se le permita crecer en la serie de tubos de dilución. Muestras microbianas son añadidas a tubos con caldos de lactosa y la presencia o ausencia de gas formado en la fermentación y da un estimado de número de células (Pascual, 1992).
- **Medio Baird Parker:** Es un medio moderadamente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos, muestras ambientales y clínica. La glicina, el cloruro de litio y el telurito potásico actúan

como agentes selectivos. La yema de huevo constituye el sustrato para determinar la producción de lecitinasa y, además, la actividad de lipasa (Merck, 1994).

- **Caldo Brilla:** Este medio está recomendado para el recuento de coliformes totales y fecales, por la técnica del número más probable. En el medio de cultivo, la peptona aporta los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo bacteriano, la bilis y el verde brillante son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gram negativas a excepción de coliformes, y la lactosa es el hidrato de carbono fermentable (Koneman, 1999). Agar PlateCount: También llamado Standard PlateCount (SPC), es un medio de crecimiento microbiológico comúnmente usado para evaluar o monitorear el crecimiento bacteriano "total" o viable de una muestra. No es un medio selectivo (Koneman, 1999).
- **Coliformes totales:** La denominación genérica coliformes designa a un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos. Coliforme significa con forma de coli, refiriéndose a la bacteria principal del grupo, la *Escherichia coli* (Brown, 2003).
- **Coliformes fecales:** Son un subgrupo de los Coliformes totales, capaces de fermentar la lactosa a 45° C en vez de 37 °C como lo hacen los totales. Constituyen un grupo con hábitat intestinal con capacidad de sobrevivencia por lo que este grupo se utiliza como indicador de contaminación fecal (Brown, 2003).

RECURSOS REQUERIDOS

Implementos de Bioseguridad

- Gorro
- Guantes

- Tapaboca
- Bata manga larga

Materiales y reactivos

- Medios de cultivo:
- Agar Platecount (SPC)
- Caldo lactosa bilis verde brillante (Caldo brilla)
- Agar Baird Parker
- Agua peptonada
- Tubos de ensayos
- Solución salina estéril
- Muestra (queso)
- Asa bacteriológica

Equipos

- Licuadora
- Mechero Bunsen
- Micropipetas
- Incubadora

METODOLOGÍA

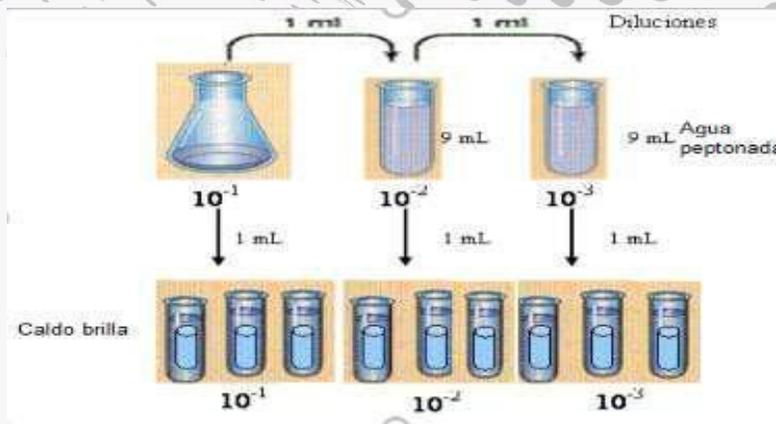
Número más probable (NMP)

Para el análisis de coliformes totales en muestra sólida como el queso se efectuará diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} para ello primero:

- Batimos 10 gramos de la muestra (queso) en 90 ml de agua peptonada estéril siendo esta la concentración 10^1 .
- Posteriormente se añadió 1ml en cada tubo de ensayo, haciendo diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}

Caldo lactosa de bilis verde brillante

- Tomar 9 tubos de ensayos de este medio líquido y en 3 tubos de ensayo se añadió 1ml para quedar una concentración de 10^{-1} de la muestra diluida a estudiar (queso).
- En otros 3 tubos de ensayo añadir 1 ml de la concentración 10^{-2} de la muestra diluida a estudiar (queso).
- Añadir 1 ml en 3 tubos de ensayos de la concentración de 10^{-3} de la muestra diluida a estudiar (queso).
- Incubar a una temperatura de 37°C por 24 horas
- Para el análisis de coliformes fecales, a partir de cada tubo positivo en el test presuntivo de coliformes totales (utilizando la técnica del NMP), incubar a 45°C por 24 horas.



Siembra en placa

Hacer siembras y cultivarlos en medios de cultivos que proporcionarán los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo:

Siembra en Superficie.

- Adicionar al medio sólido, en este caso se utilizó agar Baird Parker, un inóculo de 0.1 ml con una concentración de 10^{-2} , con la pipeta graduada estéril.
- Homogeneizar seguidamente con el asa Digrafsky.
- Incubar la caja ya sembrada en posición invertida a 37°C durante 24 horas. Observamos y registramos las características macroscópicas.



Siembra en profundidad.

- Se inocular por vertido o profundidad, 1 ml de la dilución correspondiente, mediante micropipeta.
- Luego se vertió de 18 a 20 ml del medio Plate Count tibio.
- Se mezcló cuidadosamente el inóculo con el medio.
- Se incubó la caja ya sembrada en posición invertida a 37°C durante 24 horas.
Observamos y registramos las características macroscópicas.



EVALUACIÓN

Desarrollar la guía de laboratorio

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

("Microbiology Manual Merck 12th Edition", s.f.)

Brock, T. and Madigan, M. (2015). *Biología de los microorganismos*. 12th ed. Madrid: Pearson Educación.

Brown, J.M, and M.M. McNeil. (2003). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (1999). "Diagnóstico Microbiológico". 5ª ed. Ed. Médica Panamericana SA. Buenos Aires.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. *Microbiología médica*.

8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

4. MPACTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN EL CRECIMIENTO MICROBIANO

Objetivo general

Determinar el efecto que tiene la variación de las diferentes condiciones ambientales que influyen en el crecimiento bacteriano

Objetivos específicos:

- Identificar el efecto que tiene el pH, la temperatura y la presencia o ausencia de oxígeno sobre el crecimiento de las bacterias.
- Interpretar los resultados de las diferentes pruebas realizadas.

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura MB203</i>	<i>Asignatura Fisiología microbiana</i>
---------------------	------------------------------------	---

INTRODUCCIÓN

Además de conocer los nutrientes apropiados y necesarios para el cultivo de las bacterias, también se requiere conocer las condiciones físicas del medio en donde el microorganismo pueda desarrollarse mejor. Así como las bacterias varían ampliamente con relación a sus necesidades nutricionales, también muestran diversas condiciones físicas del medio, es decir, para un buen cultivo de las bacterias se necesita combinar apropiadamente los nutrientes necesarios y las condiciones ambientales adecuadas. Los principales factores ambientales que afectan el desarrollo de una bacteria son temperatura, pH, presencia o ausencia de oxígeno, luz y disponibilidad de agua.

- **Temperatura:** Este parámetro puede influir de manera crítica en la velocidad de crecimiento y el grado de proliferación microbiana e influir en los procesos metabólicos y la morfología celular. Las bacterias se clasifican en psicrófilas (0-20°C), mesófilas (25-40°C), termófilas (40-80°C) e hipertermófilas (80-95°C)
- **Acidez o alcalinidad:** La mayoría de las bacterias crecen en un rango entre 4 y 9, pero el óptimo es de 6.5 y 7.5 generalmente en los medios de cultivo se usan sustancias amortiguadoras para mantener el pH del medio.
- **Luz:** Este requerimiento depende de si la bacteria es fototrófa o no.
- **Necesidad de gases:** El desarrollo microbiano se ve influenciado principalmente por los gases O₂ Y CO₂; Teniendo en cuenta las necesidades de oxígeno libre, las bacterias se clasifican en oxigénicas, si requieren de la presencia de oxígeno para crecer anoxigénicas facultativas, si pueden desarrollarse con o sin presencia de oxígeno, anoxigénica estrictas si no pueden desarrollarse cuando el oxígeno está presente y microaerófilas, si para crecer requieren bajas cantidades de oxígeno libre.
- **Disponibilidad de agua (presión osmótica):** Hay bacterias que requieren elevadas concentraciones de sal o azúcar en el medio para crecer de acuerdo a esto clasifican en halófilas u osmófilas, respectivamente.

RECURSOS REQUERIDOS

Implementos de Bioseguridad

- Gorro

- Guantes
- Tapaboca
- Bata manga larga

Materiales y reactivos

□ Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp*, *Bacillus spp*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*

- Medios de cultivos: caldo BHI, caldo tioglicolato.
- Asas bacteriológicas. Redonda y en punta.

Equipos

- Cámara de anaerobiosis con aditamentos
- Incubadora
-

METODOLOGÍA

Temperatura

- Sembrar 1-2 asadas de la bacteria asignada en el caldo BHI
- Incubar a 14°C, 37°C y 50°C por 24-48 horas.
- Observar presencia o no de turbidez (crecimiento bacteriano) en los diferentes rangos de temperatura de los tubos sembrados. Realizar coloración de Gram a los tubos positivos.

pH

- Inocular en los tubos de caldos BHI de 4,6 y 8 una parte de la colonia de la bacteria dada.
- Incubar a 37°C por 24-48 horas.
- Revisar si hubo crecimiento bacteriano en los diferentes rangos de pH trabajados. Realizar coloración de Gram a los tubos positivos.

4.3.3. Oxígeno y CO₂

- Realizar siembra en los diferentes medios de cultivos de la bacteria asignada.
- Incubar en las siguientes atmósferas.
- En presencia de oxígeno a 37°C por 24-48 horas (Caldo BHI)
- Cámara de anaerobiosis a 37°C por 48-72 horas (Caldo Tioglicolato)
- Atmósfera de CO₂ a 37°C por 24-48 horas (Caldo BHI)
- Observar si hubo crecimiento bacteriano (Turbidez) en los diferentes medios de cultivo practicados. Realizar coloración de Gram a los tubos positivos.

EVALUACIÓN

Desarrollar la guía de laboratorio

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico. (2009). 12th ed. Betty A. Forbes / Daniel Sahm / Alice Weissfeld.

Woolverton, C., Willey, J., Sherwood, L., Klein, D., Harley, J. and Prescott, L. (2013). *Prescott, Harvey y Klein Microbiología, séptima edición*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España.

Brock, T. and Madigan, M. (2015). *Biología de los microorganismos*. 12th ed. Madrid: Pearson Educación.

Woolverton, C., Willey, J., Sherwood, L., Klein, D., Harley, J. and Prescott, L. (2013). *Prescott, Harvey y Klein Microbiología, séptima edición*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España.

Brown, J.M, and M.M. McNeil. (2003). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

5. DISEÑO DE UNA COLUMNA DE WINOGRADSKY

Objetivo general

Cultivar un ecosistema con condiciones controladas en laboratorio donde que permita estudiar la interrelación metabólica de diversidades bacterianas

Objetivos específicos

- Demostrar mediante la columna de Winogradsky cómo los microorganismos ocupan "microespacios" específicos de acuerdo con sus tolerancias medioambientales y sus necesidades vitales.
- Identificar las zonas de desarrollo adecuadas para distintos tipos de microorganismos de acuerdo a las necesidades y reacciones que llevan a cabo.
- Interpretar los resultados de la prueba realizada y reconocer el rol que juegan las condiciones ambientales para el desarrollo de estos microorganismos.

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura MB203</i>	<i>Asignatura Fisiología microbiana</i>
---------------------	------------------------------------	---

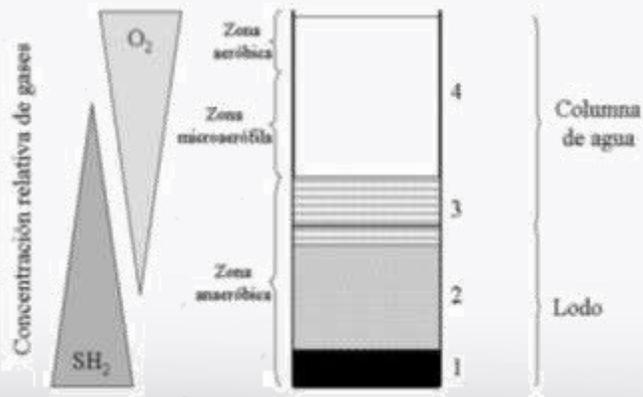
Introducción

Desarrollada inicialmente por el microbiólogo ruso Sergey Winogradsky (1853-1956), constituye un modelo de ecosistema, similar a los tapetes microbianos que se hallan en aguas dulces o saladas, donde proliferan microorganismos del medio acuático y de los sedimentos, principalmente bacterias fotosintéticas. El nombre de columna deriva de que se suelen emplear cilindros de vidrio o de plástico en su construcción. La altura de la misma permite diferenciar tres zonas características, en base a su concentración relativa de oxígeno. Por un lado, la zona cercana a la superficie o zona aeróbica dispone de una alta concentración de este gas. Inmediatamente debajo, se localiza la zona de

microaerofilia, con una concentración parcial de O₂. Por último, la zona anaeróbica o anóxica, constituye el lecho de lodo (López, 2008)

Dibujo esquemático de una columna de Winogradsky

Cuando la columna se expone a la luz solar o la proporcionada por la incandescencia de un filamento de tungsteno de una lámpara de laboratorio, la abundancia de luz roja e infrarroja es absorbida por las clorofilas y bacterioclorofilas, desarrollándose las poblaciones de microorganismos fotosintéticos. Donde la zona inferior, de color negro intenso, denota la presencia de microorganismos reductores de sulfato, caso de los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* o *Desulfomonas*. La coloración es debida a la precipitación de sulfuro de metales pesados (hierro, manganeso), tal y como describe de forma parcial la siguiente reacción química y como se observa en la siguiente imagen:



Columna de Winogradsky preparada en un cilindro de plástico transparente.

De la imagen anterior, nótese la diferencia poblacional en base a la variedad de colores que aparecen en el lecho de arena y columna de agua. (1) Algas fotosintéticas. (2) Bacterias rojas del azufre (*Chromatium*spp.). (3) Depósito de sulfuro de metales pesados asociado a la presencia de microorganismos reductores de sulfato (López, 2008).

Los sulfuros producidos por esta compleja comunidad microbiana, bajo condiciones anóxicas, son fuente de electrones para las bacterias fotosintéticas rojas y verdes del azufre alojadas en un estrato superior, caso de los géneros microbianos: *Chromatium*, *Thiocapsa* o *Thiospirillum*. Las bacterias rojas del azufre, mayoritarias en este tipo de modelo experimental, comprenden un grupo de microorganismos anaeróbicos, parcialmente sensibles a la presencia de oxígeno molecular y sulfuro de hidrógeno.

En la parte superior de la columna, cuando la producción de sulfuro de hidrógeno no es muy abundante, se desarrolla toda una variada comunidad microbiana caracterizada por cianobacterias y microalgas, que determinan la producción de oxígeno en su entorno más inmediato. Si, por el contrario, es capaz de llegar procedente de las zonas profundas de la columna cierta cantidad de sulfhídrico, seremos capaces de observar algunas bacterias incoloras del azufre, *Beggiatoa* y *Thiothrix* (Madigan et al, 2003).

RECURSOS REQUERIDOS

Implementos de Bioseguridad

- Gorro
- Guantes
- Tapaboca

- Bata manga larga

Materialès y reactivos

- Espátula
- Papel periódico
- Bella plástica de aproximadamente 500 ml
- Lodo con abundante materia orgánica
- CaCO₃
- CaSO₄
- Na₂CO₃
- NH₄Cl

Equipos

- Balanza

METODOLOGÍA

- Para armar la columna se necesita una botella plástica de 100 ml
- Se añade celulosa como fuente de carbono y energía, típicamente en tiras de rasgadas de papel periódico, esto se utiliza en una zona intermedia evitando la superficie y tratando de mantener la cadena trófica
- La columna debe ser rellenaada $\frac{1}{3}$ de su volúmen con materia orgánica proveniente del lodo
- Se añade CaSO₄ como fuente de sulfato y CaCO₃ como un agente tampón de pH a la mezcla
- Se le añade huevo al lodo como fuente de enriquecimiento y adición de azufre; adicionalmente se le agrega NaHCO₃, NH₄Cl y tampón fosfato pH 7,3.

- Después de compactar la mezcla para eliminar las burbujas de aire y obtener una capa de aproximadamente 10 cm de grosor, se procede a llenar casi por completo con agua de charco dejando aproximadamente 5 cm de espacio superior.
- Para evitar la evaporación se utiliza la tapa de la botella con una adición de papel aluminio
- Se deja reposar durante varias semanas en un lugar expuesto a la luz solar
- La columna debe ser examinada para identificar sus cambios durante los días registrando cada una de las capas, su color e incluso grosor, para finalmente ser examinado a nivel microbiológico

EVALUACIÓN

Desarrollar la guía de laboratorio

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico. (2009). 12th ed. Betty A. Forbes / Daniel Sahm / Alice Weissfeld.

López, P. J. La columna de Winogradsky. Un ejemplo de microbiología básica en un laboratorio de educación secundaria. Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias [en línea] 2008, 5 (septiembre): [Fecha de consulta: 30 de mayo de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92050311>> ISSN

López Tévez, Leonor. Medios de cultivo. [En línea]. Disponible en:
<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>

6. IDENTIFICACIÓN DE ENZIMAS PRODUCIDAS POR LAS BACTERIAS, REALIZANDO PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Objetivo General

Determinar la actividad enzimática de las bacterias como respuestas adaptativas a ciertos ambientes.

Objetivos específicos

- Reconocer la función de cada enzima presente en un microorganismo y distinguir su actividad ante un medio que le provea los nutrientes.
- Tener la capacidad de inducir la actividad enzimática de una bacteria.

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura MB203</i>	<i>Asignatura Fisiología microbiana</i>
---------------------	------------------------------------	---

INTRODUCCIÓN

El metabolismo bacteriano abarca una serie de procesos bioquímicos que incluye la fermentación, respiración, utilización de proteínas, carbohidratos, hidratos carbónicos y la producción de diversos compuestos, resaltando los compuestos enzimáticos. Estas actividades metabólicas generan productos específicos que pueden ser detectados mediante pruebas bioquímicas.

Esta identificación bacteriana puede tardar entre 18 y 24 horas tratándose de un cultivo puro; sin embargo, cada microorganismo necesita condiciones diferentes para poder llevar a cabo un desarrollo óptimo según sus características metabólicas. Por ello, en este tipo de procedimientos se lleva a cabo una estandarización que regule la actividad microbiana que regule las reacciones microbianas de manera individual, frente a cada prueba bioquímica empleada.

RECURSOS REQUERIDOS

Implementos de Bioseguridad

- Gorro
- Guantes
- Tapaboca
- Bata manga larga
- Cepas bacterianas en agar nutritivo: (*Streptococcus* y *Staphylococcus*,)
- Asa bacteriológica
- Reactivo de Kovacs impregnado en tiras de papel de filtro
- Cepas bacterianas: (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*)
- Asa bacteriológica
- Portaobjetos
- Agua estéril
- Agua oxigenada fresca
- Cepas bacterianas: (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Micrococcus*)
- Asa bacteriológica.
- Tubos de hemólisis con gelatina nutritiva.

Equipos

- Mechero
- Incubadora

METODOLOGÍA

Prueba de oxidasa:

Es una prueba encargada de la detección de la presencia de la enzima citocromo c oxidasa en bacterias, la cual juega un papel importante en la respiración celular aeróbica. Esta prueba me permite distinguir la formación de agua peróxido hidrógeno ocasionado por variedad de bacterias de las cuales se permiten diferenciar especies de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Micrococcus*, además diferencia a la familia de Enterobacterias y algunas especies del género *Pseudomonas*.

- Tomar con el asa bacteriológica estéril una colonia del cultivo puro
- Extender la colonia pura por el papel filtro impregnado con el reactivo de Kovacs.
- Después de aproximadamente 10 segundos, observar la coloración
- Lectura de resultados:

Resultado positivo: El cambio de color azul en la tira de papel filtro señala la oxidación del compuesto, resultando la formación de azul de indofenol.

Resultado negativo: El color de la tira no cambia

Prueba de catalasa: La prueba se emplea para confirmar la presencia de la enzima catalasa en un cultivo puro microbiano

Esta prueba permite distinguir entre positivos y negativos, en los cuales se encuentran:

- Positivos: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*
- *Streptococcus*, *Erysipelothrix*, *Clostridium*, *Corynebacterium pyogenes*
Corynebacterium haemolyticum

Cabe resaltar que algunas especies pueden presentar variabilidad, un ejemplo de ellas es *Moraxella bovis*

- En una lámina portaobjetos limpia, colocar una gota de agua
- Hacer una suspensión espesa en la lámina son dos asadas del cultivo puro
- Añadir dos gotas de peróxido de hidrógeno

- Lectura de resultados:

Resultado positivo: Desprendimiento de O₂, es decir, formación de burbujeo

Resultado negativo: No hay desprendimiento de O₂

Prueba de licuefacción de la gelatina:

La prueba de licuefacción de gelatina se utiliza para determinar la capacidad de los microorganismos para producir enzimas gelatinasas las cuales son proteolíticas que degradan la gelatina. Permite diferenciar especies como:

- Microorganismos con capacidad positiva: *Staphylococcus aureus* (+) de *S. epidermidis*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium haemolyticum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens* y especies de *Flavobacterium*

- Microorganismos con capacidad negativa: *Listeria monocytogenes*
- Variables y lentas: *Corynebacterium pyogenes* y *Micrococcus*

Pasos:

- Se deja un tubo con gelatina nutritiva sin inocular como prueba control y los demás se inoculan por la técnica de punción
- Incubar por un tiempo de 48 horas a una temperatura de 37°C
- Por un período de dos horas colocar en refrigeración para posteriormente observar crecimiento o licuación
- Lectura de resultados

Resultado positivo: La prueba control se debe mantener sólida y la prueba inoculada debe estar líquida

Resultado negativo: El tubo debe mantenerse sólido y se incuba nuevamente para su confirmación

EVALUACIÓN

Desarrollar la guía de laboratorio

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bioquímica. (2015). 2nd ed. Elena Feduchi Canosa / Carlos Romero Magdalena /
Esther Yáñez Conde / Isabel Blasco Castiñeyra / Carlota García-Hoz Jiménez.

Brock, T. and Madigan, M. (2015). *Biología de los microorganismos*. 12th ed. Madrid:
Pearson Educación.

7. PRUEBAS BIOQUÍMICAS CONVENCIONALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS

Objetivo general

Aprender a identificar por medio de las pruebas bioquímicas los microorganismos de enterobacterias.

Objetivos específicos:

- Realizar pruebas bioquímicas en medio de cultivos para sustratos específicos que permitan identificar bacterias y algunas rutas metabólicas de las mismas.
- Poner en prácticas las técnicas de punción y estría.

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura MB203</i>	<i>Asignatura Fisiología microbiana</i>
---------------------	------------------------------------	---

INTRODUCCIÓN

Las enterobacterias son bacterias Gram negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de cocos o bacilos. Los miembros de este grupo forman parte del microbiota del intestino (llamados coliformes) y de otros órganos del ser humano y de otras especies animales (MacFaddin, 2004).

Las diferencias entre los nombres de los diversos géneros provienen de criterios más precisos, como la fermentación de los diferentes azúcares, la producción o no de azufre, la presencia de enzimas metabólicas (Pascual, 1992).

RECURSOS REQUERIDOS

Implementos de Bioseguridad

- Gorro
- Guantes
- Tapaboca
- Bata manga larga

Materiales y reactivos

- Tubos con medio de cultivo con urea
- Tubos con agar citrato de Simmons
- Tubos con medio de cultivo SIM
- Tubo con medio LIA
- Asa bacteriológica
- Tubos con agar TSI
- Reactivo de Kovács
- Caldo MR-VP
- Indicador de pH rojo de metilo
- Mechero

Equipos

- Incubadora

METODOLOGÍA

Fermentación de hidratos de carbono - TSI (agar triple azúcar hierro):

La cepa en estudio se inócula con un asa recta en el tubo con TSI solidificado en plano inclinado:

- Se toma con el asa recta una pequeña porción de la cepa.
- Se atraviesa el asa recta, con la porción de cepa, el medio TSI hasta casi la parte profunda del tubo.
- Luego se retira en línea recta el asa del fondo.
- Al llegar a la superficie se realiza una siembra por estría en el bisel del medio.
- Luego se lleva a incubar a 37° C durante 24 horas.

Producción de sulfuro de hidrógeno, indol y movilidad – prueba SIM:

Se inócula con un asa redonda en el tubo con medio SIM semisólido:

- Se toma con el asa redonda una pequeña porción de la cepa.
- Se inócula por punción hasta la mitad del tubo.
- Se incuba por 24 horas a 37°C.
- Transcurrido el tiempo se le adiciona 2 gotas de reactivo de Kovacs en la parte superficial para detectar la presencia de Indol, se observa si hay presencia de sulfuro de hidrógeno por ennegrecimiento en alguna zona y por otro lado se observa la movilidad a través de la presencia de turbidez.

Caldos MR-VP:

Se inocula con un asa redonda en los tubos con caldo MR (Rojo de metilo) y VP (Voges Proskauer):

- Se toma con el asa redonda una pequeña porción de la cepa.
- Se inocula por punción hasta la mitad del tubo.
- Se incuba por 24 horas a 37°C.

Transcurrido el tiempo se le adicionan 3 gotas del indicador de pH rojo de metilo en la parte superficial del tubo con caldo MR y al tubo con caldo VP se le agrega 3 gotas de KOH al 40% y 2 gotas de alfa naftol al 5%, luego se mezclan y se deja reposar.

Producción de ureasa:

Se inocula con un asa recta en el tubo con medio UREA solidificada en plano inclinado:

- Se toma con el asa recta una pequeña porción de la cepa bacteriana.
- Se siembra por estría solamente en superficie (bisel) del medio.
- Se incuba por 24 horas a 37°C.

Descarboxilación de lisina:

Se inocula con un asa recta en el tubo con medio LIA solidificado en plano inclinado:

- Se toma con el asa recta una pequeña porción de la cepa.

- Se atraviesa el asa recta, con la porción de cepa, el medio LIA hasta casi la parte profunda del tubo.
- Luego se retira en línea recta el asa del fondo.
- Al llegar a la superficie se realiza una siembra por estría en el bisel del medio.
- Luego se lleva a incubar a 37° C durante 24 horas.

Utilización de citrato:

Se trabaja en tubos de ensayo con agar citrato de Simmons solidificado en plano inclinado:

- Se toma con el asa recta una pequeña porción de la cepa.
- Se inocula realizando estrías en la superficie (bisel) del medio.
- Se incuba por 24 horas a 37°C.

EVALUACIÓN

Elaborar informe de laboratorio

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bioquímica. (2015). 2nd ed. Elena Feduchi Canosa / Carlos Romero Magdalena / Esther Yáñez Conde / Isabel Blasco Castiñeyra / Carlota García-Hoz Jiménez.

MacFaddin, J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª edición. Buenos aires: Medica Panamericana.

8. PRUEBAS BIOQUÍMICAS CONVENCIONALES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS NO FERMENTADORES

Objetivo general

Identificar por medio de las pruebas bioquímicas convencionales bacilos no fermentadores.

Objetivos específicos:

- Conocer el uso de las pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismo bacilos Gram negativos no fermentadores.
- Analizar los respectivos resultados y por medio de estos hacer una previa interpretación de si el microorganismo es no fermentador.

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura MB203</i>	<i>Asignatura Fisiología microbiana</i>
---------------------	------------------------------------	---

INTRODUCCIÓN

Los bacilos Gram negativos no fermentadores son un grupo de microorganismos aerobios estrictos, con flagelos polares, no son esporulados, no utilizan hidratos de carbono como fuente de energía o los degradan a través de vías metabólicas diferentes de la fermentación, son generalmente oxidasa positiva. Un microbiólogo puede sospechar que un bacilo Gram negativo desconocido es miembro del grupo de no fermentadores al observar, además, la falta de crecimiento en agar MacConkey. Algunos de los géneros de no fermentadores son: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, etc. (Koneman, 1999).

RECURSOS REQUERIDOS

Implementos de Bioseguridad

- Gorro
- Guantes
- Tapaboca
- Bata manga larg

Materiales y reactivos

- Aceite mineral estéril
- Tubo con medio OF con la inscripción “Abierto”
- Tubo con medio OF con la inscripción “Cerrado”
- Campanas de Durham
- Caldo nitrato
- Tubo con medio UREA
- Tubo con medio SIM
- Reactivo de Kovacs
- Caldo nitrato
- Campanas de Durham
- Asas bacteriológicas

Equipos

- Incubadora

METODOLOGÍA

Utilización de hidratos de glucosa - medio para oxidación-fermentación (OF):

Con 2 tubos de medio para oxidación-fermentación (OF) a los que se le rotula un tubo con la inscripción “Abierto” y otro tubo con la inscripción: “Cerrado”:

- Se toma con el asa recta una pequeña porción de la cepa bacteriana.
- Se siembra por punción en el medio el tubo con la inscripción “Abierto”.

- Así mismo se siembra por punción en el tubo con la inscripción “Cerrado” pero luego se cubre en la superficie con aceite mineral estéril para impedir el ingreso de oxígeno.
- Ambos tubos se incuban por 24 horas a 37°C.

Hidrólisis de la urea

Se inocula con un asa recta en el tubo con medio UREA solidificada en plano inclinado:

- Se toma con el asa recta una pequeña porción de la cepa.
- Se siembra solamente en superficie (bisel) del medio.
- Se incuba por 24 horas a 37°C.

Movilidad y producción de indol – prueba SIM

Se inocula con un asa redonda en el tubo con medio SIM semisólido:

- Se toma con el asa redonda una pequeña porción de la cepa.
- Se inocula por punción hasta la mitad del tubo.
- Se incuba por 24 horas a 37°C.
- Transcurrido el tiempo se le adiciona 2 gotas de reactivo de Kovács en la parte superficial para detectar la presencia de Indol y se observa la movilidad a través de la presencia de turbidez.

Reducción de nitrato

En un tubo con caldo nitrato y con campana de Durham:

- Se toma con el asa recta una pequeña porción de la cepa bacteriana.
- Se siembra por punción agitando en el medio.
- Se incuba por 24 horas a 37°C.

EVALUACIÓN

Elaborar informe de laboratorio

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schneckenburger PC, Winn WC (1999).
"Diagnóstico Microbiológico". 5ª ed. Ed. Médica Panamericana SA. Buenos Aires.

9. APLICACIÓN DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS ESPECÍFICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAM POSITIVOS

Objetivo general

Investigar y conocer pruebas bioquímicas confirmatorias que permiten la identificación de especies de cocos Grampositivos.

Objetivos específicos:

- Analizar las características macroscópicas, microscópicas y las reacciones visualizadas en los medios de cultivo producidas por los cambios inducidos por la actividad microbiana
- Aplicar pruebas bioquímicas específicas para determinar género y especie de una cepa bacteriana no caracterizada.

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura</i> <i>MB203</i>	<i>Asignatura</i> <i>Fisiología microbiana</i>
---------------------	--	---

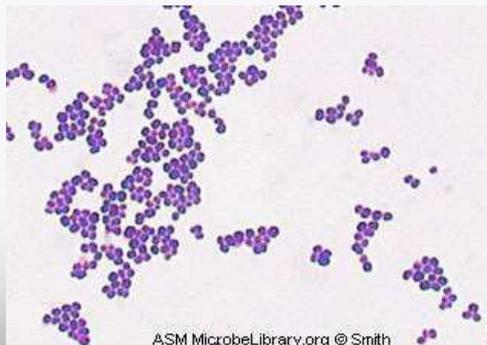
INTRODUCCIÓN

Los cocos Gram positivos son microorganismos unicelulares, caracterizados por presentar una forma esférica, en la que algunas de sus especies se agrupan en diferentes patrones, de manera que son clasificados por su forma en diplococos, los cuales son cocos asociados en parejas como *Streptococcus pneumoniae*; los *Staphylococcus* como *S.aureus* forman esferas que se agrupan en racimos de uvas debido a su división en varios ejes, mientras que los *Streptococcus* se organizan en cadenas de esferas que es producto de su división a lo largo del eje. La formación de 4 micrococcus en forma de

cuadros se denominan tetracos y también conocidos como tetrágenos o tétradas y la formación de 8 o más micrococos se denomina sarcina.

Staphylococcus son género de bacterias que incluyen varias especies, alguna de las cuales se puede colonizar de manera transitoria a los individuos y esta colonización se refiere a la presencia temporal bacteriana en superficies de la piel, mucosas, tracto gastrointestinal, entre otros, las cuales no pueden causar enfermedades; sin embargo, en ciertas condiciones estos microorganismos pueden ser oportunistas y producir patologías mediante la producción de toxinas que conllevan a afectaciones sistémicas. De igual forma, los *Streptococcus* colonizan de manera transitoria y pueden formar parte del microbiota normal, es decir que no causa daños; sin embargo, puede causar afecciones cuando el sistema inmunológico se encuentre debilitado específicamente en pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes que incluyen infecciones graves.

Por otra parte, considerados patógenos oportunistas, los *Enterococcus* son bacterias que normalmente colonizan el tracto gastrointestinal y también hacen parte del microbiota normal, aunque es un microorganismo generalmente benigno, muchas de sus especies pueden comportarse como patógenos provocando bacteriemias, endocarditis, infecciones urinarias y otras complicaciones. Sus complicaciones suelen ser preocupante ya que muchas de sus especies presentan alta resistencia a medicamentos y según sus requerimientos ellas se clasifican en anaerobios facultativos y aerobios dentro de los cuales se encuentran *Staphylococcus*, *Stomacoccus* *Micrococcus*, y *Planococcus*, perteneciente a la familia *Micrococcaceae*; de la misma manera, los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*; los géneros *Peptococcus* y *Peptostreptococcus* representan los aerobios estrictos (Madigan et al, 2003).



RECURSOS REQUERIDOS

Implementos de Bioseguridad

- Gorro
- Guantes
- Tapaboca
- Batá manga larga

Materiales y reactivos

- Cepa bacteriana.
- Agares: nutritivo, Muller hinton, sangre, DNasa y manitol al 7%
- Tubo con EDTA 0.5
- Azúcares: sacarosa, glucosa, maltosa y manitol cada uno con 5ml 0.5 al 1%
- Caldo nitrato.
- Oxidasa
- Tubos estériles
- Manosa con 5ml 0.5 al 1%
- Fosfatasa Alcalina.
- Discos de Novobiocina
- Centrifugadora
- Alcohol
- Asas bacteriológicas
- Papel absorbente y algodón
- Mechero y fósforos
- Reactivos para tinción Gram
- Gradilla
- Láminas portaobjetos
- Cinta de enmascarar

Equipos

- Microscopio
- Incubadora.

METODOLOGÍA

Para identificar el microorganismo presente se toma una cepa bacteriana en un análisis que emplea pruebas bioquímicas convencionales; esta técnica en específico está diseñada para la determinación e identificación de *Staphylococcus* con un enfoque principal en la especie *S. aureus*. Esta identificación se lleva a cabo a través de una serie de pasos definidos:

Siembra en Agar Nutritivo

- Se toma una muestra del microorganismo cultivado en la caja de Petri con el asa bacteriológica previamente esterilizada en el mechero
- La muestra se siembra en una caja de Petri con agar nutritivo, previamente rotulado.
- La muestra se siembra mediante la técnica de agotamiento para conseguir colonias aisladas
- La caja debe ser sellada e incubada por 24 horas a una temperatura de 37°C

Presencia de catalasa

- En una lámina portaobjetos nueva se agrega una colonia tomada con un asa bacteriológica previamente flameada

- Para identificación de la catalasa se toma peróxido de hidrógeno al 30% y se agrega una gota en la lámina
- El resultado positivo se refleja en la presencia de burbujas y el negativo en ausencia

Presencia de Coagulasa

- Se toma una muestra del microorganismo cultivado en la caja de petri con el asa bacteriológica previamente esterilizada en el mechero
- En un tubo con 7 mm de diámetro se agregaron 0.5ml de plasma humano
- El tubo debe ser sellado e incubado periódicamente por 4 horas a una temperatura de 37°C

Siembra en agar BHI

- Se toma una muestra del microorganismo cultivado en la caja de Petri con el asa bacteriológica previamente esterilizada en el mechero
- La muestra se transfiere a una caja de Petri con agar BHI previamente sellada y rotulada
- La muestra se siembra mediante la técnica de agotamiento para conseguir colonias aisladas
- Con una pinza esterilizada se distribuyen 3 sensidiscos Novobiocina en la caja Petri
- La caja debe ser sellada e incubada por 24 horas a una temperatura de 37°C

Presencia de DNasa

- Se toma una muestra del microorganismo cultivado en la caja de petri con el asa bacteriológica previamente esterilizada en el mechero
- La muestra se transfiere a una caja de petri con agar DNasa previamente sellada y rotulada
- La muestra se siembra mediante la técnica de agotamiento para conseguir colonias aisladas
- La caja debe ser sellada e incubada por 24 horas a una temperatura de 37°C

Presencia de sensibilidad por Novobiocina en agar Müller Hinton

- Se toma una muestra del microorganismo cultivado en la caja de Petri con el asa bacteriológica previamente esterilizada en el mechero
- La muestra se transfiere a una caja de Petri con agar Muller Hinton previamente sellada y rotulada
- La muestra se siembra mediante la técnica de agotamiento para conseguir colonias aisladas
- Con una pinza esterilizada se distribuyen 3 sensidiscos Novobiocina en la caja Petri
- La caja debe ser sellada e incubada por 24 horas a una temperatura de 37°C

Presencia de Hemólisis

- Se toma una muestra del microorganismo cultivado en la caja de Petri con el asa bacteriológica previamente esterilizada en el mechero
- La muestra se transfiere a una caja de Petri con agar sangre previamente sellada y rotulada
- La muestra se siembra mediante la técnica de agotamiento para conseguir colonias aisladas.
- La caja debe ser sellada e incubada por 24 horas a una temperatura de 37°C

Crecimiento en medio de cultivo manitol salado

- Se toma una muestra del microorganismo cultivado en la caja de Petri con el asa bacteriológica previamente esterilizada en el mechero
- La muestra se siembra en una caja de Petri con agar manitol salado, previamente rotulado.
- La muestra se siembra mediante la técnica de agotamiento para conseguir colonias aisladas
- La caja debe ser sellada e incubada por 24 horas a una temperatura de 37°C

Fermentación de azúcares, sacarosa, maltosa, glucosa y manitol

- Con el asa bacteriológica en punta, previamente flameada en el mechero, se tomaron dos muestras de microorganismos cultivados en la caja de Petri.

- Se prepararon tubos de ensayo con cada una de las azúcares, con un adicional de rojo de metilo y una campana Durhan.
- Los tubos previamente flameados bajo el mechero fueron inoculados con las muestras del microorganismo mediante la técnica de suspensión.
- Luego se flamearon los tubos al abrir y se sembró con el asa utilizando el método de siembra por suspensión.
- Después de la inoculación se incubaron por 24 horas a una temperatura de 37°C

EVALUACIÓN

Realizar un informe de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Brock, T. and Madigan, M. (2015). *Biología de los microorganismos*. 12th ed. Madrid: Pearson Educación.

Introducción a la microbiología. (2017). 12th ed. Gerard J. Tortora / Berdell R. Funke / Christine L. Case.

10. PRUEBAS BIOQUÍMICAS ESPECÍFICAS API 20E, API 20NE Y BBL CRYSTAL

Objetivo general

Realizar las pruebas de identificación correspondientes mediante API.

Objetivo específico

Establecer la metodología en la identificación de enterobacterias por medio de pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura MB203</i>	<i>Asignatura Fisiología microbiana</i>
---------------------	------------------------------------	---

INTRODUCCIÓN

Los sistemas miniaturizados API son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar. Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H₂S, la determinación de la hidrólisis de la gelatina, entre otras.

El API 20E es un sistema estandarizado que permite la identificación de Enterobacterias y otros bacilos Gram negativos no exigentes, que incluye 21 test bioquímicos miniaturizados, así como una base de datos. La galería del sistema API 20E se compone

de 20 microtubos que contienen los substratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstruye los test. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de colores espontáneos o revelados mediante acción de reactivos.

API 20 NE Permite la identificación de bacilos Gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias como por ejemplo *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, entre otros. Es una galería conformada por 20 microtubos.

RECURSOS REQUERIDOS

Implementos de Bioseguridad

- Gorro
- Guantes
- Tapaboca
- Bata manga larga

Materiales y reactivos

- Asa de platino
- Tubo con solución salina estéril
- API 20 E
- API 20 NE
- Solución salina estéril
- Pinzas
- Muestra sin identificar
- Agua

Instrumentos

- Estufa
- Incubadora.
- Pipeta automática y puntas de pipeta
- Mechero Bunsen

METODOLOGÍA

SISTEMA API 20E

- Preparar la base de la caja del API añadiendo unos 5ml de agua para que penetre en los alvéolos y así crear una cámara húmeda, quitar el exceso.
- Con el asa de siembra coger una colonia grande y añadirla al tubo de solución salina estéril y mezclar suavemente.
- Introducir la suspensión en los tubos de la galería 20E, con la tira inclinada y dejando resbalar por las paredes de los tubos.
- Llenar también la cúpula en aquellos tubos cuyos nombres están metidos en un cubo.
- En los tubos en los que los nombres están subrayados se añade parafina líquida en las cúpulas para crear anaerobiosis.
- Meter en la caja de API para conservar en cámara húmeda.
- Incubar a 37°C durante 24h.

Pueba	Reacción / Enzimas	Negativo	Positivo
ONPG	beta-galactosidasa	sin color	amarillo
ADH	arginina deshidrolasa	amarillo	rojo o naranja
LDC	lisina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
ODC	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo o naranja
CIT	utilización del citrato	verde	azul oscuro o turquesa
H2S	producción de H ₂ S	sin precipitado negro	precipitado negro
URE	ureasa	amarillo	rojo o naranja
TDA	triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojo
IND	producción de indol	amarillo	color rosa o anillo rosa-rojo
VP	producción de acetoina (Voges-Proskauer)	sin color	rosa-rojo
GEL	gelatinasa	sin difusión	difusión de pigmento
GLU	fermentación/oxidación de glucosa	azul o verde	amarillo
MAN	fermentación/oxidación de manitol	azul o verde	amarillo
INO	fermentación/oxidación de inositol	azul o verde	amarillo
SOR	fermentación/oxidación de sorbitol	azul o verde	amarillo
RHA	fermentación/oxidación de ramnosa	azul o verde	amarillo
SAC	fermentación/oxidación de sacarosa	azul o verde	amarillo
MEL	fermentación/oxidación de melobiosa	azul o verde	amarillo
AMY	fermentación/oxidación de amigdalina	azul o verde	amarillo
ARA	fermentación/oxidación de arabinosa	azul o verde	amarillo
OX	citocromo oxidasa		

EVALUACIÓN

Elaborar informe de laboratorio

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

CMLAB, C. M. (s.f.-b). Sistema de identificación bacteriana API Biomerieux - CMLAB SAS. Recuperado de <http://www.cmlab.com.co/producto/sistema-de-identificacion-bacteriana-api-biomerieux/>

Winklerltda, B. D. (s.f.). Sistemas de Identificación BBL Crystal ID Equipo para la identificación de bacterias grampositivas. Recuperado de <http://winklerltda.cl/quimicav2/wp-content/uploads/2017/04/grampositivos.pdf>

Society for General Microbiology, “About microbiology”, Microbiology Online. Disponible en: Consultado el 4 de septiembre de 2015.

Carroll, K.C. (2013). The streptococci, enterococci and related genera. In: Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology (26ta ed., pp. 209-227). McGraw-Hill. Recuperado de: http://microbiology.sbm.ac.ir/uploads/jawetz_2013__medical_miceobiology.pdf

Vandepitter, J, Verhaegen, J., Enbaek, K, Rohner, P., Piot, P. & Heuck C.C (2003). Basic laboratory precedures in clinical bacteriology (2da ed.). World Health Organization Geneva. Recuperado de: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/42696>

Herrera K, Cobar O, De León J, Rodas A, Boburg S, Quan J, Pernilla L, et al. Impacto de la calidad microbiológica del aire externo en el ambiente interno de cuatro laboratorios de instituciones públicas en la ciudad de Guatemala y Bárcenas, Villa Nueva. Revista Científica. 2012; 22(1):30-38.

Romero C, Castañeda D, Acosta G. Determinación de la calidad bacteriológica del aire en un laboratorio de microbiología en la Universidad Distrital Francisco José de Caldas en Bogotá, Colombia. NOVA. 2016; 13 (26): 129-137.

Tangarife V. Cladophialophora spp. Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. 2011.

Conalepfelixtovar, C. (2012, 26 septiembre). Técnicas y métodos de aislamiento y selección de microorganismos. Recuperado 9 noviembre, 2019, de

<https://conalepfelixtovar.wordpress.com/2012/09/26/tecnicas-y-metodos-de-aislamiento-y-seleccion-de-microorganismos/>

Flora normal de la garganta. (s.f.). Recuperado de <https://www.uprm.edu/labs4375/wp-content/uploads/sites/175/2018/08/lab-4-flora-normal-de-la-garganta.pdf>

RODRIGUEZ, K. R. P. K. (s.f.). El hábitat de los microbios. Recuperado de https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_2/PDF/HabitatMicrobios.pdf

Biocodex Microbiote Institute. (s.f.). Recuperado 9 noviembre, 2019, de <https://www.biocodexmicrobiotainstitute.com/es/pulmonar>

Bailey & Scott. Diagnóstico Microbiológico. (2009). 12th ed. Betty A. Forbes / Daniel Sahm / Alice Weissfeld.

Woolverton, C., Willey, J., Sherwood, L., Klein, D., Harley, J. and Prescott, L. (2013). *Prescott, Harvey y Klein Microbiología, séptima edición*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España.

Brock, T. and Madigan, M. (2015). *Biología de los microorganismos*. 12th ed. Madrid: Pearson Educación. ("Microbiology Manual Merck 12th Edition", s.f.)

Brown, J.M, and M.M. McNeil. (2003). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC (1999). "Diagnóstico Microbiológico". 5ª ed. Ed. Médica Panamericana SA. Buenos Aires.

López, P. J. La columna de Winogradsky. Un ejemplo de microbiología básica en un laboratorio de educación secundaria. Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias [en línea] 2008, 5 (septiembre): [Fecha de consulta: 30 de mayo de 2017] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92050311>> ISSN López Tévez, Leonor. Medios de cultivo. [En línea]. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>

MacFaddin, J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª edición. Buenos aires: Medica Panamericana.

Madigan M.T, Martinko J.M., Stahl D and Clark D.P., Brock Biology of microorganisms, 13th edition, UK, Pearson Benjamin Cummings, 2010.

Tortora G.J., Funke B.R. and Case C.L., Microbiology: An Introduction with Mastering Microbiology, 11th edition, UK, Pearson Benjamin Cummings, 2012.

Bonifaz A., Micología Médica Básica, 3a edición, México, D.F., McGraw-Hill Interamericana, 2010.

John C. Sherris, James J. Champoux, PHD, Frederick C. Neidhardt, PHD, W. Lawrance Drew, MD. PHD, James. Plorde, MD. 2004. MICROBIOLOGÍA MÉDICA "Una introducción a las enfermedades infecciosas", 4th Ed. Mc Graw Hill.

Claudia Valdés-Miranda Cros, Zoe Plasencia López. 2006. Dreamweaver 8., 1ª Edición., Ed. ANAY

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. Microbiología médica. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017

11. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS ACUÁTICOS, TERRESTRES Y AÉREOS

Objetivo

Aislar e identificar variedades de microorganismos presentes en suelo, agua y aire.

Semestre: IV

*Código asignatura
MB203*

*Asignatura
Fisiología microbiana*

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos, omnipresentes en la naturaleza en poblaciones puras, requieren de un aislamiento e identificación de cultivos puros que sean completamente viable para su caracterización; este proceso implica la separación específica de un microorganismo y otro en una muestra con base a un procedimiento que conlleva diluciones seriadas o siembra en medios de cultivos, los cuales deben estar en condiciones óptimas y de mantenimiento con el fin de que se mantenga el crecimiento microbiano y se puedan obtener colonias viables y visibles, para mantener sus futuras generaciones. En estas fases se aplican estrategias específicas de aislamiento con base a las condiciones requeridas por el microorganismo posterior a su identificación. Algunos de estos microorganismos se clasifican en:

Microorganismos acuáticos: El agua es vital para los seres vivos; sin embargo, son importantes y críticos en la salud y en los cuerpos de agua tanto dulce como salada, ya que los medios acuáticos son fuentes de transmisión para aquellos microorganismos que residen en el tracto gastrointestinal. pero a la vez humano y animal, es decir, microorganismos entéricos. Debido a ello, los tratamientos de agua son críticos y rigurosos, pero a la vez presentan complicaciones debido al desarrollo volitivo bacteriano cultivable y el control de estos.

Microorganismos de suelo o tierra: El suelo está compuesto por una mezcla de minerales, que varían según las condiciones geográficas, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos; Estos minerales interactúan entre sí para determinar las propiedades físicas, químicas

y biológicas del suelo que influyen directamente en la actividad microbiana y desarrollan roles importantes en la salud del suelo, adquisición de nutrientes y crecimiento vegetal.

Microorganismos de aire o ambiente: La atmósfera actúa como vehículo para la dispersión microbiana, el cual ocurre en distintas escalas, se puede presentar desde distancias cortas y llegar a sobrepasar el continente. Esta dispersión puede tener implicaciones significativas en diversas áreas en donde se ve implicada la sanidad humana, animal, vegetal e incluso afecta la economía e influye en la biodiversidad, estructuración y evolución microbiana.

Por ello, el propósito de esta práctica fue aislar e identificar variedades de microorganismos presentes en suelo, agua y aire.

RECURSOS REQUERIDOS		
· Pipetas de 10 ml	· Espátula	· Agua destilada
· Tubos de ensayo	· Pipeteador	
· Frascos schott de 500 ml	· Autoclave	
· Vidrio reloj	· Balanza analítica	
· Cajas de Petri	· NaCl 0.85%	
· Micropipeta (punta amarillas)	· Agar Nutritivo	
· Plancha de calentamiento	· Agar PDA	

METODOLOGÍA

Preparación de medios de cultivo (Agar nutritivo y PDA) y de agua peptona

Teniendo en cuenta las proporciones específicas estipuladas por el fabricante, se prepararon 350 ml de agar nutritivo y 50 ml de agar PDA, los cuales pasaron por un proceso de esterilización en autoclave a una temperatura de 121 °C por un tiempo de 25 minutos, luego de ser servidas las placas se sometieron para comprobar su esterilidad.

Preparación de la solución diluyente, agua peptonada

Según lo estipulado en la ficha del medio, se siguieron las recomendaciones de la casa comercial en donde se prepararon 200 ml para seis tubos con una cantidad aproximada de 3 cc los cuales fueron autoclavados a una temperatura de 121 °C por 25 minutos.

Aislamiento microbiano de muestras de suelo

Para este aislamiento se realizó un pool con 100 g de tierra aproximadamente, de la cual se pesó 1 g y se utilizaron 9 ml de agua peptonada para realizar una dilución madre de 10-1; tras homogeneizar la solución y dejar que los residuos sólidos se decantaran se prepararon las diluciones 10-2 y 10-3; posteriormente, con ayuda de un asa de drigalsky fueron sembradas en un medio no selectivo, agar nutritivo para luego dejar a una temperatura ambiente por una semana y observar el crecimiento.

Aislamiento microbiano de muestras de agua

En una botella plástica totalmente limpia se tomó una muestra de agua procedente de charcos, luego en 9mL de agua peptonada se agregó 1ml de la muestra dando origen a una solución madre rotulada como 10-1, posteriormente se llevaron a cabo diluciones en 10-2 y 10-3 con el mismo diluyente. Estas diluciones con ayuda de un asa de drigalsky fueron sembradas en un medio no selectivo, agar nutritivo para luego dejar a una temperatura ambiente por una semana y observar el crecimiento.

Aislamiento microbiano aéreo

Exponer durante un tiempo estimado de 15 minutos una caja de Petri con Agar PDA al aire libre y luego se incubó durante una semana bajo revisión diaria para observar su crecimiento microbiano

Evaluación del crecimiento de los microorganismos

Transcurrido el tiempo determinado, se dio la identificación de las características a nivel macroscópico y microscópico. La primera etapa consistió en conteo, forma, elevación y coloración de las colonias y la segunda se realizó una tinción Gram para las colonias identificadas como bacterias y una tinción con azul de lactofenol para aquellas con características de levaduras y hongos miceliales.

EVALUACIÓN

Elaborar informe de laboratorio

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Álvarez María del Mar, B. L. (s.f.). *Aislamiento de Microorganismos en diferentes ambientes (Suelo, Agua y Aire)*. Obtenido de:

<https://repository.unilibre.edu.co/handle/10901/17596>

12. NITRIFICACIÓN Y DENITRIFICACIÓN

Objetivo

Evaluar las características con propiedades que expresan resultados diferenciales dictados por los microorganismos en cuanto a la reducción de NO_3 a NO_2 o Nitrógeno gas libre.

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura MB203</i>	<i>Asignatura Fisiología microbiana</i>
---------------------	------------------------------------	---

INTRODUCCIÓN

En proceso de nitrificación las bacterias autótrofas convierten el NH_4 en NO_3 en un ambiente aerobio y rico en carbono inorgánico, posteriormente, las bacterias heterótrofas reducen el NO_3 a N_2 (gas inerte que hace parte en mayoría a un componente atmosférico) en un ambiente anóxico, pero en presencia de carbono orgánico; este proceso de nitrificación y desnitrificación es el eje central para la eliminación de nitrógeno en residuos.

Reactivos y medios de cultivos requeridos

Caldo Nitrato	3 a 4 cc
Peptona	5.0 g
Nitrato de potasio	1.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Agua desionizada	1 L

Para culminar con la preparación del reactivo Griess, se mezcla hasta que esté totalmente disuelto, libre y se autoclava por 15 minutos a una temperatura de 125°C.

Solución A

<i>Ácido acético 5N</i>	1000,0 mL
<i>Ácido sulfanílico</i>	8.0 g

Solución B

<i>Ácido acético 5N</i>	1000,0 mL
<i>α-Naftilamina</i>	5.0 g

Actualmente se está utilizando α -naftol, ácido de Cleve y N,N-dimetil-1-naftilamina debido a que se ha demostrado en poder cancerígeno de α -naftilamina

METODOLOGÍA

Se transfiere una porción de cultivo puro al medio utilizado, con ayuda de un asa bacteriológica esterilizada, este debe ser incubado en un tiempo de 12 a 24 horas a una temperatura de 35 °C; pasado el tiempo estipulado se agregan de 2 a 3 gotas de solución A y B del reactivo Griess, el cual nos permite determinar y verificar si el nitrato ha sido reducido a nitrito, reflejando una coloración rojiza en el resultado como se muestra a continuación:

Positivo

Negativo



Revelación:

- Se agrega una mínima cantidad de polvo de zinc en caso de una reacción negativa, para confirmar la negatividad de la reacción se debe reflejar un color rojizo o rosado.
- La ausencia de color indica que se ha producido una desnitrificación es decir que los nitratos pasaron a N_2 mediante reducción.

Los resultados se visualizan como se muestra en las siguientes imágenes:



Negativo

Positivo

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Reducción de nitratos y desnitrificación. Tomado de:

https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/nitratos.pdf&ved=2ahUKEwi_q5WF_4bpAhVFJt8KHfYeAtEQFjAEegQIAxAB&usg=AOvVaw3MOgTVJv338B8y_JSCRM63&cshid=1587935116090

13. FUENTES DE ENERGÍA BACTERIANA AMINOÁCIDOS

Objetivo general

Aprender a identificar por medio de las pruebas bioquímicas los procesos de utilización de carbohidratos como fuentes de energía por las bacterias.

Objetivos específicos.

- Realizar pruebas de fermentación y oxidación en cepa bacteriana para identificar la ruta metabólica, así mismo de la prueba SIM.
- Realizar la prueba de Ureasa en cepa bacteriana para determinar la presencia de esta enzima.
- Observar los cambios de color e interpretar las reacciones ocurridas en cada medio de cultivo utilizado.

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura</i> <i>MB203</i>	<i>Asignatura</i> <i>Fisiología microbiana</i>
---------------------	--	---

INTRODUCCIÓN

Para el estudio del proceso de utilización de azúcares por microorganismos se emplean medios de cultivo enriquecidos con productos útiles para el metabolismo celular, los cuales es preciso detallar:

Medio para oxidación-fermentación (OF): Medio de cultivo, que, al ser suplementado con hidratos de carbono, se usa para determinar el metabolismo oxidativo-fermentativo de las bacterias Gram negativas. Esta prueba es útil para

diferenciar especies bacterianas. También, permite determinar movilidad y producción de gas (Forbes, 2004).

Ureasa-medio para la prueba: Medio utilizado para la identificación de microorganismos, en base a la actividad ureásica. Es particularmente útil para diferenciar *Proteus* spp. de otros miembros de la familia Enterobacteriaceae. El extracto de levadura es la única fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y cofactores, y aporta los nutrientes esenciales para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfatos constituyen el sistema buffer, el rojo de fenol es el indicador de pH y la urea es el sustrato de la enzima ureasa (MacFaddin, 2004).

SIM (sulfuro-indol-movilidad): Es un medio semisólido destinado para verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo. Es útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae (MacFaddin, 2004).

Sulfuro: La capacidad de ciertas especies bacterianas para liberar azufre de los aminoácidos que contiene azufre u otros compuestos en forma de H₂S, se evidencia con ennegrecimiento en el medio (Koneman, 2004).

Indol: El indol es uno de los productos de degradación del metabolismo de aminoácidos triptófanos. Las bacterias que tienen la enzima triptofanasa pueden escindir el triptófano y producir el indol (Koneman, 2004).

Movilidad: Este determinante es esencial para identificar las bacterias que se mueven por medio de flagelos (MacFaddin, 2004).

RECURSOS REQUERIDOS

Implementos de Bioseguridad

- Gorro

- Guantes
- Tapaboca
- Bata manga larga

Materiales y reactivos

- Cepas bacterianas.
- 2 tubos con medio de cultivo para oxidación-fermentación (OF)
- 1 tubo con medio de cultivo con urea
- 1 tubo con medio de cultivo SIM
- Asa bacteriológica

Equipos

- Mechero
- Incubadora

METODOLOGÍA

Primero realizamos la identificación de la utilización de hidratos de carbono en medios de cultivo especiales que contienen los sustratos:

Medio para oxidación-fermentación (OF):

Con 2 tubos de medio para oxidación-fermentación (OF) a los que se le rotula un tubo con la inscripción “Abierto” y otro tubo con la inscripción: “Cerrado”:

- Se toma con el asa recta una pequeña porción de la cepa bacteriana.
- Se siembra por punción en el medio el tubo con la inscripción “Abierto”.

- Así mismo se siembra por punción en el tubo con la inscripción “Cerrado” pero luego se cubre en la superficie con aceite mineral estéril para impedir el ingreso de oxígeno.
- Ambos tubos se incuban por 24 horas a 37°C.

Medio Ureasa

Se inocula con un asa recta en el tubo con medio UREA solidificada en plano inclinado:

- Se toma con el asa recta una pequeña porción de la cepa bacteriana.
- Se siembra por estría solamente en superficie (bisel) del medio.
- Se incuba por 24 horas a 37°C.

SIM (sulfuros, indol y movilidad):

Se inocula con un asa recta en el tubo con medio SIM semisólido:

- Se toma con el asa recta una pequeña porción de la cepa bacteriana.
- Se inocula por punción hasta la mitad del tubo.
- Se incuba por 24 horas a 37°C.
- Transcurrido el tiempo se le debe adicionar 2 gotas de reactivo de Kovacs en la parte superficial para detectar la presencia de Indol.

EVALUACIÓN

Desarrollar la guía de laboratorio

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Betty A. Forbes, Daniel Sahm, Alice Weissfeld.(2009). "Diagnóstico Microbiológico", Ed. Médica Panamericana

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schneckenburger PC, Winn WC (2008). "Diagnóstico Microbiológico". 6ª ed. Ed. Médica Panamericana SA. Buenos Aires.

MacFaddin, J. (2004). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª edición. Buenos aires: Medica Panamericana.

14. DISEÑO DE UNA CURVA DE CRECIMIENTO

OBJETIVO

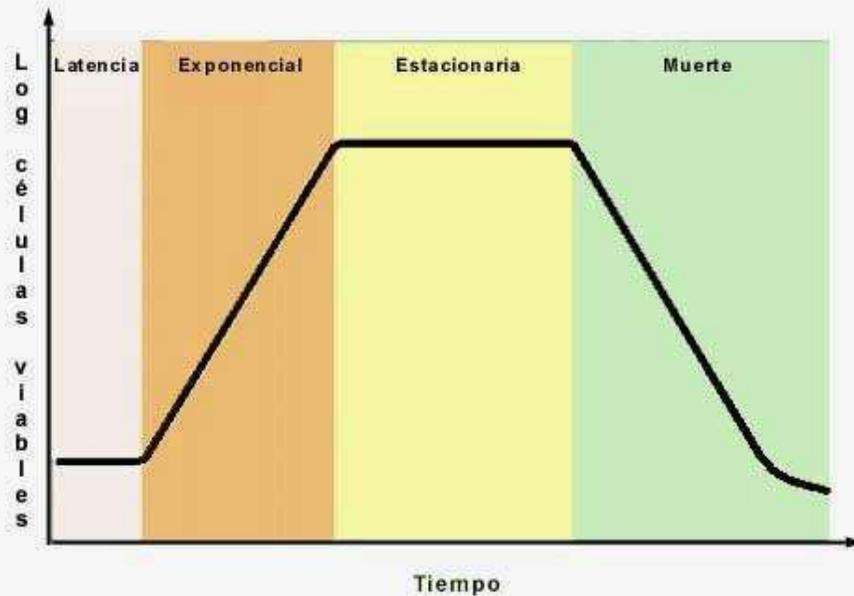
Monitorear el crecimiento de los microorganismos e identificar fases, velocidad y tiempo de generación de la población microbiana en estudio, mediante la instrucción y fortalecimiento de los estudiantes en el uso de la turbidimetría.

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura</i> <i>MB203</i>	<i>Asignatura</i> <i>Fisiología microbiana</i>
---------------------	--	---

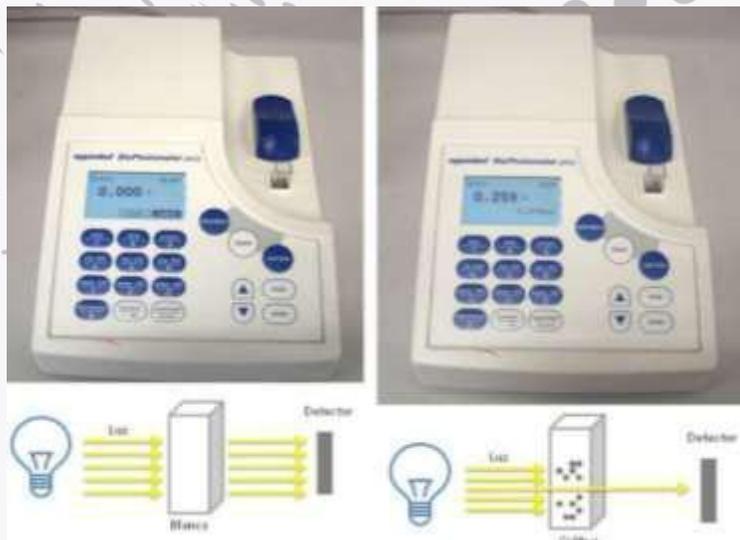
INTRODUCCIÓN

El crecimiento microbiano es una fase fundamental en la microbiología que consiste en el aumento en número de microorganismos en el tiempo; a diferencia del crecimiento en tamaño, el crecimiento microbiano se mide por la proliferación de células. La fisión binaria es el método de reproducción más común en el caso de bacterias, para que se lleve a cabo este proceso y se establecen tiempos de duplicación y generación. Estos intervalos pueden variar significativamente según las condiciones físicas y químicas del entorno, que influyen directamente en su proliferación, como lo son la disponibilidad de nutrientes, temperatura, entre otros.

FASES DE CRECIMIENTO



Las distintas fases de crecimiento microbiano se revelan mediante una representación gráfica que expone diferentes fases de crecimiento, destacando la fase en donde la velocidad de crecimiento es proporcional a la concentración de biomasa, esta fase es la comúnmente denominada estacionaria. Para medir el crecimiento microbiano se emplea la cuantificación en número de microorganismos totales o viables, medición proteica y de biomasa, y en alguno de los casos se determina la actividad metabólica llevada a cabo por la bacteria. Los métodos más usados en estos casos es la turbidimetría, que por medio de la turbidez se estima la cantidad de microorganismos, y mediante espectrofotometría, que permite determinar la cantidad de luz que atraviesa la muestra. En esta fase se evalúa la transmitancia y absorbancia, la primera indica el porcentaje de luz que pasa a través de la muestra en relación con la prueba blanco y la segunda la cantidad de luz que se absorbe por suspensión celular; mediante esta determinación se grafican las dinámicas de población microbiana en diferentes condiciones.



Turbidimetría: Una parte de la luz toma un desvío, otra se absorbe y el restante pasa a ser transmitida cuando la luz incide en el microorganismo y aquella que no pasa por la absorción o dispersión reporta mediante cuantificación

RECURSOS REQUERIDOS

Implementos de Bioseguridad

- Gorros desechables
- Guantes de latex
- Tapabocas
- Bata antifluidos, manga larga

Materiales y reactivos

Suministros del cuerpo docente

Los materiales e insumos requeridos están destinados por grupos con un número de 4 o 5 alumnos o para el alumnado en total en caso de que se informe, con una totalidad máxima de 25 estudiantes. Todos los insumos deben estar bajo condiciones asépticas.

Material	Cantidad
Matraz de Erlenmeyer de 125 mL estériles con tapa de gasa	3
Cultivo de E. coli líquido en fase estacionaria (10mL)	1
Frasco de 250 mL con 100 mL de caldo nutritivo	1

Suministros que deben tener los estudiantes

Material	Cantidad
Mechera	1
Algodón	1
Marcador de vidrio	1
Paños o toallas de absorción	1
Cinta de enmascarar	1

Solicitados al personal del laboratorio

Los materiales e insumos requeridos están destinados por grupos con un número de 4 o 5 alumnos o para el alumnado en total en caso de que se informe, con una totalidad máxima de 25 estudiantes. Todos los insumos deben estar bajo condiciones asépticas

Material/reactivo	Cantidad
Probeta estéril taponadas con gasa o algodón	1
Mechero de alcohol	1
Espátula	1
Dispensador manual para pipeta serológica	1
Pisetas de agua destilada, etanol y cloro	3
Caja de puntas estériles	1
Pipeta serológica en vidrio con un volumen de 5ml	1
micropipeta automática de 200 a 1000 μ L	1
Gradilla para celdas	1
Celdas de espectrofotometría	3

- 1 dispensador manual para pipeta serológica § 3 pisetas (agua destilada, etanol y cloro)

METODOLOGÍA

1. En un área totalmente esterilizada, en un matraz de erlenmeyer con un volumen de 125 mL se vierten 25 mL de caldo.
2. Utilizando un vortex, los inóculos deben ser homogenizados y se inoculan 2 matraces por duplicado con 2.5 mL en condiciones estériles. para llevar a cabo la calibración del espectrofotómetro se vierte 1 mL de medio sin inocular como prueba blanca
3. Llevar a Incubación los matraces a una temperatura de 37 °C con agitación orbital ajustada entre 150 y 250 rpm.
4. Los matraces deben ser retirados de la incubadora en un lapso de 30 minutos y se toma 1 mL luego de ser agitado y con un espectrofotómetro calibrado, se mide a 600 nm (DO600) su densidad óptica. En caso de que exceda el valor de 1, se realiza una dilución de la muestra 1 en 10 (1/10) y se repite el proceso de medir su densidad óptica.

EVALUACIÓN

Teniendo en cuenta y llevando a cabo lo establecido en la guía, registra en el cuadro de datos de DO600, obtenidos en distintos intervalos del tiempo, teniendo en cuenta el factor de dilución si es requerido; posteriormente se lleva a cabo la construcción de una curva de crecimiento en una escala logarítmica, el cual debe ser reportado con su respectiva descripción y los tiempos a registrar son los establecidos en la tabla a continuación:

Tiempo	DO ₆₀₀ medida	Dilución	DO ₆₀₀ calculada*
0			
30 min			
1 hora			
1 hora 30 min			
2 horas			
2 horas 30 min			
3 horas			
3 horas 30 min			
4 horas			

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bonilla, M., Pajares, S., Viguera, J. y Sigala, J. (2016). Microbiología básica. Departamento de Procesos y Tecnología División de Ciencias Naturales e Ingeniería UAM-Cuajimalpa.
 Recuperado de:
http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/23Manual%20de%20microbiologia_09diciembre2016.pdf

15. REDUCCIÓN DESASIMILATIVA DE SULFATO (PRODUCCIÓN DE H₂S EN LOS MEDIOS DE CULTIVOS).

Objetivos

- Analizar la presencia de microorganismos que tienen la capacidad de producir H₂S
- Observar las propiedades de cada agar utilizado en cuanto al aislamiento y diferenciación de enterobacterias patógenas como *Salmonella*

<i>Semestre: IV</i>	<i>Código asignatura MB203</i>	<i>Asignatura Fisiología microbiana</i>
---------------------	------------------------------------	---

INTRODUCCIÓN

Las bacterias reductoras de sulfato son microorganismos procariotas, bacterias y arqueas, las cuales en su metabolismo llevan a cabo una reacción desasimiladora del sulfato y tienen la capacidad de utilizar sulfato como aceptor de e- terminal, es decir que pueden usar el sulfato como aceptor terminal de electrones.

Muchas de estas bacterias hacen parte de uno de los 4 linajes de la filogenia:

- Proteobacterias hemofílicas que incluyen los géneros *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfobulbus*, *Desulfovibrio*
- Bacterias termofílicas correspondiente a las Gram negativas, las cuales hacen parte del género *Thermodesulfovibrio*
- Bacterias Gram positivas, correspondientes al género *Desulfomaculum*
- *Archaeoglobus* representada por las *Euryarqueota*.
- *Thermodesulfobiaceae* hace parte del quinto linaje

De acuerdo a lo mencionado por Parra (2008), en un hábitat anóxica rica en sulfato, las bacterias reductoras de sulfato exhiben una notable versatilidad al utilizar diversos aceptores de electrones distintos al sulfato, como lo es el S° , nitrato y fumarato en su respiración anaerobias; estos microorganismos anaerobios estrictos pueden crecer exclusivamente mediante la reducción del sulfato en ausencia total del oxígeno molecular, además, se encuentran ampliamente distribuidos en hábitats en zonas terrestres y acuáticas que mediante los compuestos microbianos en descomposición se convierten el anóxicos.

RECURSOS REQUERIDOS

Instrumentaria de bioseguridad empleada

- Gorro
- Guantes
- Tapaboca
- Bata blanca

Materiales y reactivos

- Cepa bacteriana en este caso *Salmonella*
- Asa bacteriológica
- Portaobjetos
- Bateria de Gram
- Agares (Hektoen, SS, XLD.)

Equipos

- Microscopio
- Incubadora

METODOLOGÍA

- Se realiza un extendido en una lámina portaobjetos, con la ayuda de un asa bacteriológica con muestra de la bacteria asignada, en este caso, *Salmonella*.
- Se deja secar a temperatura ambiente y luego se realiza la coloración de Gram, para observar microscópicamente su morfología.
- Se realiza una siembra por agotamiento de *Salmonella* en los agares Hektoen, SS, XLD.
- Se incuban las siembras a 37°C por 48 horas y pasado este lapso se analizan los resultados

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Parra D. (2008). Aislamiento y caracterización bioquímica y morfológica de las bacterias reductoras de sulfato (BRP) provenientes de aguas de producción de un campo de petróleo. Bucaramanga, Universidad Industrial del Santander. Slideshare.

Recuperado de: <https://www.slideshare.net/mobile/edisonjairo/aislamiento-y-caracterizacion-de-bacterias-sulfato-reductoras>



Eiddec
EDITORIAL