**PRÁCTICA DE NUTRICIÓN MICROBIANA Y**

**REQUERIMIENTOS DE OXÍGENO**

**INTRODUCCIÓN**

La nutrición es el proceso por el cual los seres vivos toman del medio donde habitan, los compuestos químicos que necesitan para llevar a cabo sus procesos energéticos y biosintéticos que les permiten crecer y reproducirse.

Los requerimientos nutricionales de cada grupo microbiano están dados por la composición química de las células que los constituyen y por sus características genéticas las que determinan sus propiedades fisiológicas y su capacidad para utilizar y transformar los compuestos que se encuentran en el ambiente en que se desarrollan.

En general los requerimientos nutricionales de los microorganismos reflejan el ambiente natural en que viven; este conocimiento y el uso de medios de cultivo de composición química definida, son de primordial importancia en el estudio de la nutrición microbiana cuyas características varían ampliamente entre los microorganismos. Algunos tienen requerimientos nutricionales muy simples, obtienen su energía de compuestos inorgánicos y utilizan CO2 o carbonatos como fuente de carbono, en tanto que otros requieren de compuestos orgánicos con diferentes grados de complejidad. La fuente de nitrógeno, la obtienen a partir de aminoácidos o nitrógeno inorgánico en diferentes estados de oxidación incluyendo el nitrógeno molecular. Respecto a los requerimientos de oxígeno, los microorganismos pueden vivir con diferentes concentraciones de este elemento.

En el siguiente experimento se pondrán de manifiesto el tipo de nutrición y necesidades de oxígeno de diferentes microorganismos, para ello, estos se inocularán en dos medios de cultivo, en el primero se variarán las fuentes de carbono y de nitrógeno y en el segundo la tensión de oxígeno y se relacionarán sus características nutricionales con el desarrollo y las transformaciones químicas microbianas obtenidas en los diferentes medios de cultivo.

**OBJETIVOS**

Mediante este ejercicio se logrará:

* Reconocer y describir las necesidades nutricionales de los microorganismos.
* Relacionar la composición de los medios de cultivo con las características nutricionales específicas de los microorganismos.
* Relacionar los productos detectados con los procesos energéticos y asimilatorios efectuados por los microorganismos.
* Relacionar las características de desarrollo con las necesidades de oxígeno molecular.
* Clasificar nutricionalmente a los microorganismos de acuerdo con sus fuentes de energía y requerimientos de carbono, nitrógeno y oxígeno.

**GENERALIDADES**

Algunos nutrientes constituyen los bloques a partir de los cuales la célula elabora macromoléculas estructurales y funcionales, mientras que otros sirven como donadores de electrones (fuente de energía) y algunos más como aceptores finales de electrones sin ser incorporados directamente al material celular. A veces un mismo nutriente puede desempeñar todas las funciones, lo que dependerá del tipo de microorganismo y de las condiciones ambientales.

La forma química específica bajo la cual los microorganismos adquieren el carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y oxígeno, así como su energía, es muy variable, lo que determina que los microorganismos presenten múltiples tipos nutricionales. Una clasificación nutricional sencilla es aquella que se basa en dos variables: la naturaleza de las fuentes de energía y de carbono.

Con relación a la fuente de energía los microorganismos se clasifican en dos grupos:

* **Fotótrofos**, estos utilizan la energía electromagnética (luz) para su desarrollo.
* **Quimiótrofos**, que obtienen su energía a partir de la oxidación de compuestos químicos,

que a su vez se subdividen en:

* Quimiolitótrofos (oxidación de compuestos inorgánicos)
* Quimiorganótrofos (oxidación de compuestos orgánicos)

Con respecto a la fuente de carbono, se clasifican como:

* **Autótrofos**, microorganismos que usan CO2 y carbonatos.
* **Heterótrofos**, aquellos que utilizan compuestos orgánicos.

De acuerdo con estos criterios, los microorganismos se ubican en cuatro clases nutricionales las que se describen en el cuadro 1. No obstante, la versatilidad fisiológica de los microorganismos determina que la clasificación expuesta no sea de ninguna manera estricta, como lo demuestran los siguientes ejemplos: algunos microorganismos fotoautótrofos crecen también en la oscuridad comportándose como quimioheterótrofos. Esta versatilidad se conoce con el término de facultativo. Asimismo, algunas bacterias y algas fotoautotróficas son incapaces de sintetizar alguno de sus constituyentes celulares a partir de CO2, por lo que generalmente viven asociadas con otros microorganismos que le proporcionan este componente y cuando se les cultiva en medios artificiales es necesario suministrar ese compuesto orgánico.

Es importante recalcar que aun cuando el grupo bacteriano es, desde el punto de vista estructural, el más simple de los microorganismos (procariotes); fisiológicamente es el más complejo y el único en el que se encuentran todos los tipos nutricionales descritos.

**Cuadro1. Clasificación nutricional de los microorganismos.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Clases nutricionales** | **Fuente de energía** | **Fuente de carbono** | **Ejemplos de grupos microbianos** |
| Fotoautótrofas | Luz | CO2, Carbonatos | Algas y algunas bacterias |
| Fotoheterótrofas | Luz | Compuestos orgánicos | Bacterias verdes y rojas |
| \*Quimioautótrofas | Oxidación de compuestos inorgánicos como NH3, NO2- H2, H2S. So, S2O3, Fe++ | CO2 | Bacterias oxidantes del nitrógeno, hidrógeno, azufre  y hierro |
| \*\*Quimioheterótrofas | Oxidación de compuestos orgánicos | Sustratos orgánicos | Protozoarios, hongos y la mayoría de las bacterias |

\*Debido a la capacidad distintiva de crecer en medios estrictamente minerales, también se les denomina quimiolitótrofos (de la palabra griega lithos, roca).

\*\*Estos microorganismos utilizan al mismo nutriente como fuente de carbono y de energía

A los compuestos orgánicos que actúan como precursores o como constituyentes de material celular y que no pueden ser sintetizados a partir de compuestos de carbono más sencillos se les llama colectivamente **factores de crecimiento**; éstos, por su estructura química y acción metabólica, se dividen en tres clases:

* Aminoácidos, requeridos como constituyentes de proteínas.
* Purinas y pirimidinas, requeridos como constituyentes de los ácidos nucleicos.
* Vitaminas, representadas por diversos compuestos orgánicos que forman parte de grupos prostéticos o centros activos de numerosas enzimas.

Con base en las necesidades de factores de crecimiento, se emplean otros dos términos:

* **Protótrofos**, microorganismos capaces de cubrir todas sus necesidades a partir de la fuente principal de carbono, por lo tanto no requieren factores de crecimiento.
* **Auxótrofos**, son aquellos que requieren, de uno o más nutrientes orgánicos además de la principal fuente de carbono.

El nitrógeno y el azufre se encuentran en los compuestos orgánicos de la célula, principalmente en forma reducida como grupos amino y sulfhidrilo. Los microorganismos toman dichos elementos en diferentes estados de oxidorreducción y pueden tener las siguientes funciones:

**Fuente de nitrógeno y azufre**, en cuyo caso son asimilados e incorporados al material celular.

La mayoría de los microorganismos fotosintéticos, muchas bacterias no fotosintéticas y los hongos, asimilan estos dos elementos en estado inorgánico como NO3- y SO4=, y su utilización implica una reducción preliminar; de nitratos a amoníaco y de sulfatos a sulfuro para su incorporación al material celular, este proceso se conoce como reducción asimiladora de nitratos o de sulfatos.

Otros microorganismos son incapaces de efectuar esta reducción, por lo que estos elementos deben ser proporcionados como sales de amonio, o como sulfuros, o como compuestos orgánicos que los contengan como la cisteína. En este caso, el aminoácido puede ser además fuente de carbono y de energía.

Existen algunas bacterias que son capaces de utilizar el N2 atmosférico, para ello lo reducen a amoníaco a través de un proceso también asimiIatorio denominado fijación de nitrógeno.

**Donadores de electrones**, en las bacterias quimiolitótrofas, la energía se obtiene por oxidación de amoníaco a nitritos y éstos a nitratos, como ocurre con las nitrificantes; o bien por la oxidación de sulfuros, azufre o tiosulfatos a sulfatos como lo hace *Thiobacillus thioxidans*.

**Aceptores de electrones**, en este caso los nitratos se reducen a nitritos, óxidos de nitrógeno y nitrógeno elemental a través de un proceso desasimilatorio conocido como desnitrificación. Del mismo modo los sulfatos pueden ser reducidos a sulfuros. Ambos procesos se llevan a cabo en condiciones de anaerobiosis.

El fósforo es asimilado como fosfatos de origen inorgánico u orgánico y forma parte de las membranas celulares, del material genético y del ATP. Concentraciones elevadas de fosfatos inorgánicos determinan la inhibición en el crecimiento de muchos microorganismos, aunque algunos son tolerantes.

El oxígeno, como constituyente universal de las células, es un nutrimento proporcionado en cantidades abundantes por el agua; sin embargo, la mayoría de los microorganismos requieren además oxígeno molecular. Respecto a la necesidad o tolerancia de esta molécula, se tiene que los microorganismos se clasifican en cinco grupos:

1. **Aerobios estrictos**,aquéllos que crecen de manera obligada en condiciones óxicas o aerobias con presencia de tensiones normales de oxigeno, el que utilizan como aceptor final de electrones para cubrir sus necesidades energéticas.
2. **Microaerofílicos**, los que crecen en tensiones de O2 menores a las del aire o condiciones microóxicas.
3. **Facultativos**, emplean alternativamente oxígeno molecular u otros compuestos inorgánicos u orgánicos como aceptores finales de electrones por lo que crecen de acuerdo a las condiciones que prevalecen en su hábitat, aerobias o anaerobias.
4. **Anaerobios estrictos**, aquéllos que no requieren de este elemento para su desarrollo, y la presencia de O2 inhibe su desarrollo o incluso provoca su muerte. Tal es el caso de las bacterias reductoras de sulfatos y de las bacterias metanogénicas que utilizan el CO2 como aceptor de electrones y lo reducen a metano.
5. **Aerotolerantes**,son organismos anaerobios, pero que a diferencia de los estrictos, estos toleran el O2 y crecen en su presencia aunque no puedan utilizarlo.

**MATERIAL**

Por equipo:

Pipeta automática (100 μL) con puntas estériles

Tubos de 16 x 150 con tapón de rosca con 10 mL de los medios indicados

* 1 tubo de 13 x100 medio A (sin fuente de carbono)
* 1 tubo de medio B (con carbonatos)
* 1 tubo de medio C (con glucosa)
* 1 tubo de medio D (con sacarosa)
* 1 tubo de medio E (con almidón)
* 1 tubo de medio F (con tira de papel filtro)

Tubos de ensaye de 15 x 120 con tapón de rosca con 7 mL de medio fluido de tioglicolato

Que deben tener los alumnos:

Marcador o etiquetas

Mechero

Asa

Gradilla

Tubos de 13 x 100 con 5.0 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril

Portaobjetos

Pipetas de 1.0 mL estériles o Pasteur con bulbos de goma

Para todo el grupo:

Incubadora a 37° C

Incubadora a 28° C

Cultivos de los siguientes microorganismos:

Algas

Bacterias nitrificantes

*Azotobacter* sp.

*Escherichia coli*

*Saccharomyces* sp.

Para determinar requerimientos de oxígeno molecular:

*Clostridium* sp.

*Enterobacter* sp.

*Micrococcus luteus*

*Pseudomonas* *aeruginosa*

*Streptococcus* sp.

**MÉTODO**

1. Rotular todo el material:
2. Tubos con diferentes fuentes de carbono y energía según lo indicado en el cuadro 1.
3. Los tubos con tioglicolato con el nombre de las cepas correspondientes.
4. Someter a ebullición los tubos con caldo tioglicolato hasta la completa reducción del indicador (resarzurina).
5. Colocar los tubos en una gradilla y dejar enfriar, teniendo cuidado de **no agitarlos**.
6. Inocular cada uno de los tubos de acuerdo con las instrucciones.
7. Incubar los tubos con tioglicolato fluido a 37°C durante 48 horas y los otros tubos a 28° C en las condiciones indicadas en el cuadro 2.

**NOTAS:**

* Evita tocar los diferentes medios de cultivo con la punta de la pipeta.
* Para inocular *Clostridium* sp. será necesario obtener la muestra del fondo del tubo, y evitar agitar el cultivo; del mismo modo depositar la muestra en el fondo del tubo a inocular. Este procedimiento deberá realizarse rápidamente.

***Cuadro 1*** Formulación de los medios de cultivo para establecer necesidades de energía, carbono y nitrógeno en los microorganismos en estudio.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Componente** | **Cantidad** | **MEDIO** | | | | | |
| A | B | C | D | E | F |
| Sulfato de magnesio | 0.02g | X | X | X | X | X | X |
| Fosfato dibásico de potasio | 0.2g | X | X | X | X | X | X |
| Cloruro de calcio | 0.02g | X | X | X | X | X | X |
| Solución de MoO3 | 0.05mL | X | X | X | X | X | X |
| Sol. Acuosa de FeCl3 | 0.05mL | X | X | X | X | X | X |
| Agua destilada | 1000mL | X | X | X | X | X | X |
| Cloruro de amonio al 1% |  | X | X | X | X | X | X |
| Carbonatos |  |  | X |  |  |  |  |
| Almidón |  |  |  |  |  | X |  |
| Celulosa |  |  |  |  |  |  | X |
| Glucosa |  |  |  | X |  |  |  |
| Sacarosa |  |  |  |  | X |  |  |

***Cuadro 2.*** Condiciones de incubación**.**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Clave de medio de cultivo** | **Cultivo microbiano** | **Tiempo**  **(días)** | **Otros** |
| A |  | 21 | Luz |
| B |  | Aerobiosis |
| C |  | 2 a 7 |
| D |  | 2 |
| E |  |
| F |  |

**OBSERVACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE RESULTADOS**

**MATERIAL:**

Que deben tener los alumnos:

Marcador o etiquetas

Mechero

Asa

Gradilla

Tubos de 13 x 100 con 5.0 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril

Portaobjetos

Pipetas de 1.0 mL estériles o Pasteur con bulbos de goma

Para todo el grupo:

Incubadora a 37° C

Incubadora a 28° C

**MÉTODO:**

1. Observar a los 2 días el desarrollo en los medios 3 a 6 y a los 21 días en los medios 1 y 2.
2. Registrar los resultados en el cuadro 3.
3. Revisar el crecimiento en cada uno de los tubos con tioglicolato **sin agitar el tubo**, describir la zona donde se presenta el desarrollo a las 48 horas de incubación.
4. Registrar los resultados en el cuadro 4.

***Cuadro 3.* Crecimiento en los diferentes medios de cultivo.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Clave del medio de cultivo** | **Microorganismo** | **Tiempo de incubación (días)** | | |
| 2 | 6 | 21 |
| A |  |  |  |  |
| B |  |  |  |  |
| C |  |  |  |  |
| D |  |  |  |  |
| E |  |  |  |  |
| F |  |  |  |  |

ND = No determinado

\*+++ = abundante, ++ = medio, + = escaso, - = sin desarrollo.

***Cuadro 4.* Requerimientos de oxígeno de las cepas inoculadas en tioglicolato fluido.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Microorganismo** | **Zona de desarrollo en el tubo** | **Clasificación** |
| *Pseudomonas aeruginosa* |  |  |
| *Enterobacter* sp |  |  |
| *Microccus luteus* |  |  |
| *Streptococcus* sp |  |  |
| *Clostridium* sp |  |  |

**GUÍA DE OBSERVACIÓN**

Con base en los resultados obtenidos y la información previamente consultada:

1. Indicar si hay relación entre el tipo de microorganismos y las fuentes de carbono y energía de los medios de cultivo empleados.
2. Con base en los resultados obtenidos en el tioglicolato fluido y la información previamente consultada. Indicar si hay relación entre el patrón de desarrollo a lo largo del tubo y los microorganismos empleados.
3. Explicar el papel que desempeña el oxígeno en el metabolismo microbiano.
4. Consultar otra bibliografía e indicar si los microorganismos en estudio requieren de factores de crecimiento y cómo se clasifican con relación a sus necesidades de oxígeno molecular.

**DISPOSICIÓN DE DESECHOS**

* Esterilizar los tubos en autoclave, para ello:
* Retirar las etiquetas, marcas de plumón o masking-tape empleados para identificar el material.
* Colocar los tubos en botes metálicos
* Esterilizar.
* Lavar el material de vidrio.
* Depositar el papel de envoltura en el bote de basura correspondiente.

**BIBLIOGRAFÍA**

Atlas, R. M. & Bartha, R. Y. (2002). Ecología microbiana y Microbiología ambiental. España: Pearson Educación, S. A.

Cappuccino, J. & Sherman, N. (2010). Microbiology: A laboratory manual. California.: Benjamin Cummings

Madigan, T. M., Martinko, M. J., Dunlap, V. P. & Clark, P. D. (2009). Brock. Biología de los microorganismos *.*España: Pearson Educación, S. A.

Prescott, L. M., Harley, J. P. y Klein, D. A. (1999). Microbiología. España: Mc Graw-Hill-Interamericana.

Ramírez-Gama, R. M., Luna, B., Velásquez, O., Vierna, L., Mejía, A. G., Tsuzuki, M. G., Hernández, L., Camacho, A. y Urzúa, M. C. (2015). Manual de Prácticas de Microbiología General. México: UNAM, Facultad de Química.

Tortora, J.G., Funke, R.B. y Case, L.C. (2007). Microbiology an introduction. San Francisco: Pearson Education Inc.

Vullo, D., Wachsman, M. y Alche, L. (2000). Microbiología en práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de microbiología básica y aplicada. Argentina: Atlante S. R. L.