

Fisiología Microbiana

Tarea de aula 2B

Metabolismo

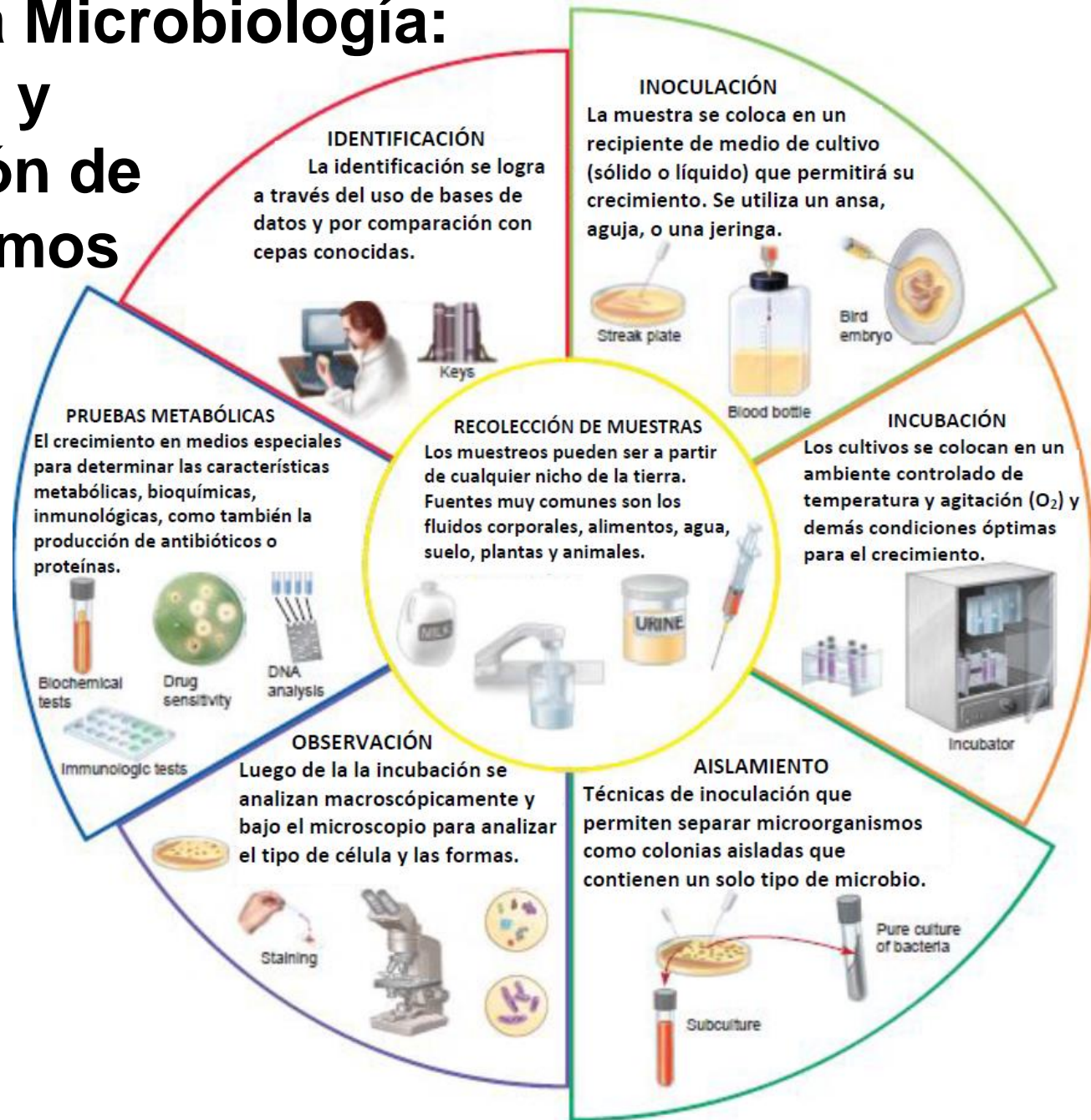
Producción de Exoenzimas

Producción de Antibióticos

Trabajos Prácticos

- **TP1: Técnicas generales de Microbiología.**
 - Manejo de material de laboratorio.
 - Práctica de Técnicas Asépticas.
 - Métodos de siembra y aislamiento.
- **TP2: Aislamiento y análisis de microorganismos.**
 - Aislamiento a partir de diferentes nichos
 - Enriquecimiento y repiques de colonias
 - Observaciones microscópicas. Coloraciones
 - **Metabolismo.**
 - **Producción de exoenzimas y antibióticos.**
- **TP3: Crecimiento**
 - Curva de crecimiento.
 - CIM y antibiograma
- **TP4: Ecología Microbiana y comportamiento bacteriano comunitario**
 - Winogradsky
 - Cuerpos fructíferos, swarming, biofilms
 - Matriz extracelular en biofilms

Objetivo de la Microbiología: Identificación y caracterización de microorganismos

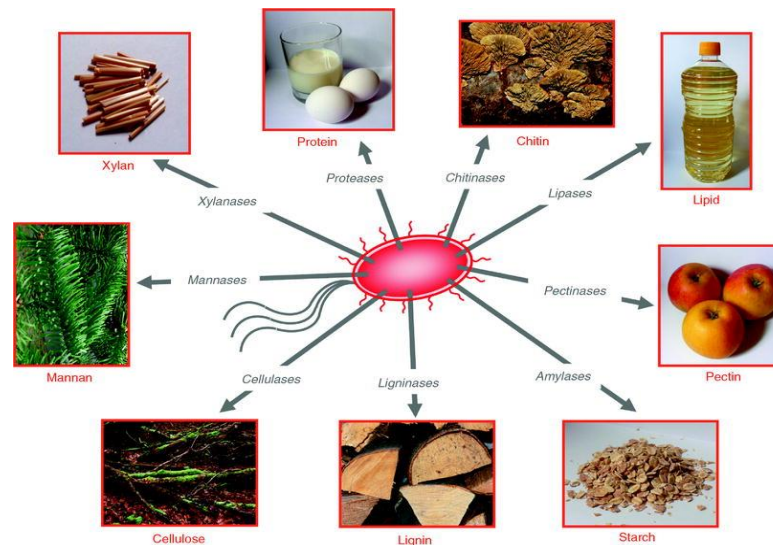


Trabajo Práctico N° 2B: **Características metabólicas. Medios especiales.**

OBJETIVOS:

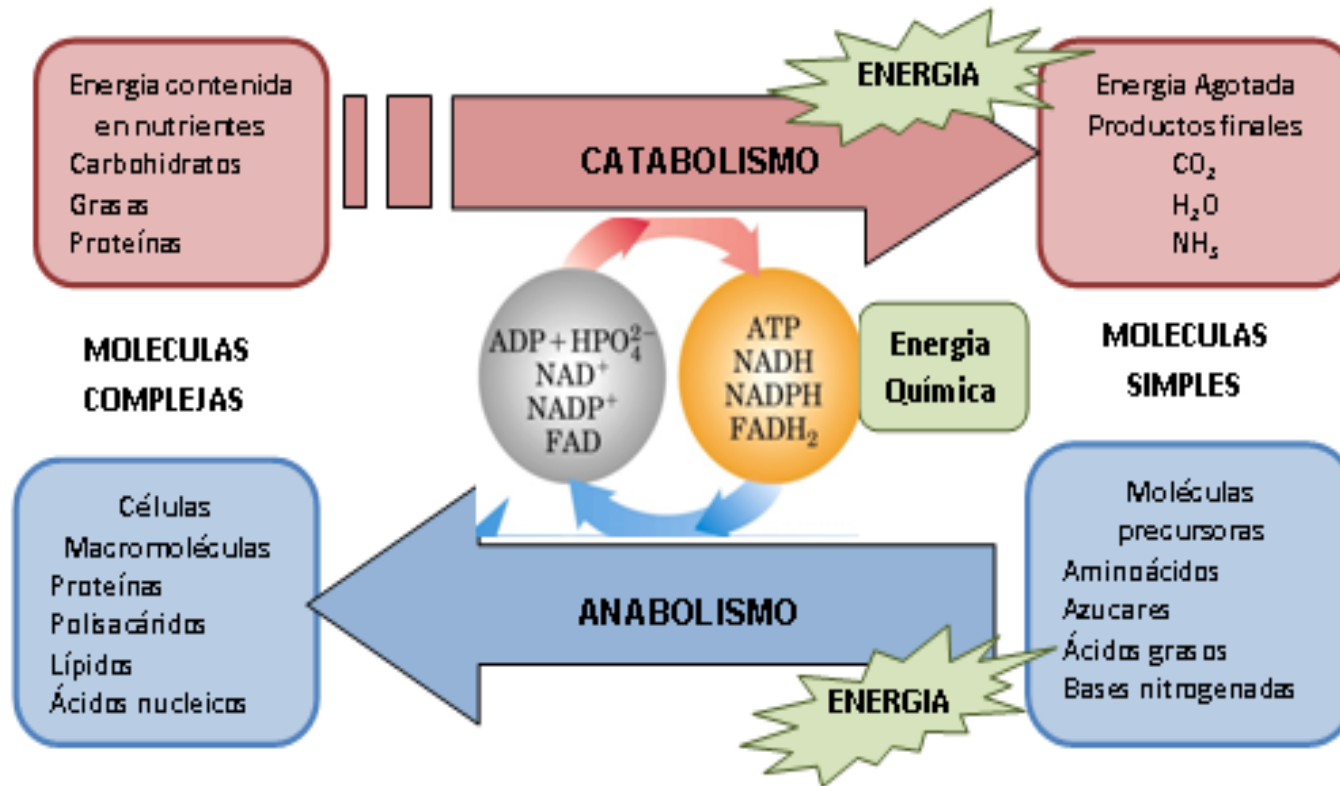
Evaluar las capacidades metabólicas de Cepas provenientes de distintos nichos y sus requerimientos nutricionales (concepto de auxotrofía) y respuesta frente al O₂.

Evaluar la producción de antibióticos y exoenzimas de relevancia industrial en las cepas aisladas de diferentes muestras de suelo.



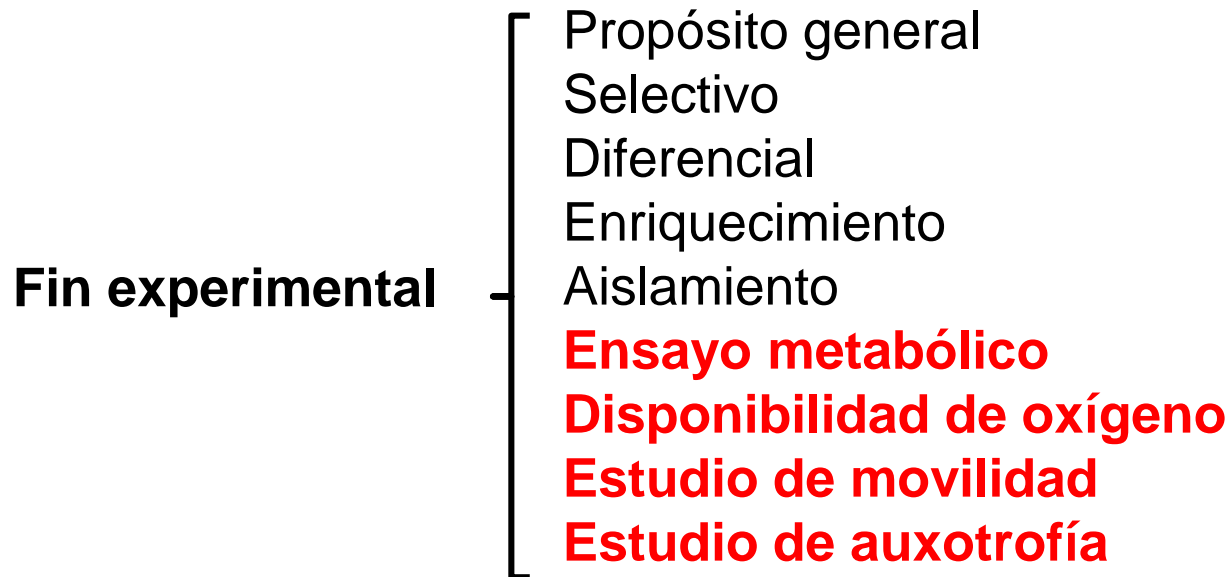
Metabolismo microbiano:

Conjunto de reacciones químicas que se dan en un organismo catalizadas por un sistema enzimático cuya finalidad es el intercambio de materia y energía entre la célula y el entorno.



Metabolismo degradativo = CATABOLISMO (produce Energía)
Metabolismo constructivo = ANABOLISMO (necesita Energía)

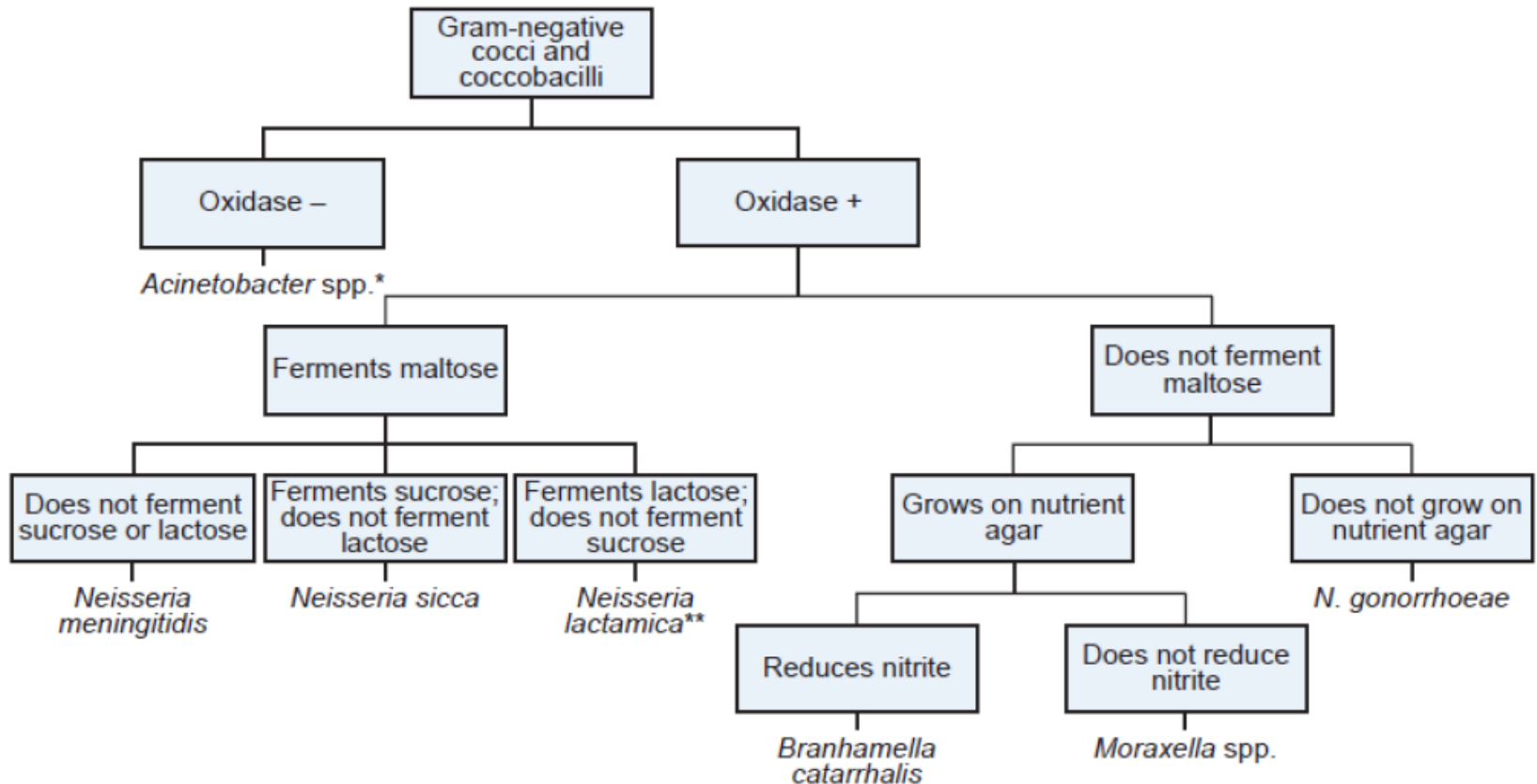
Clasificación de medios de cultivo



Caracterización metabólica de microorganismos

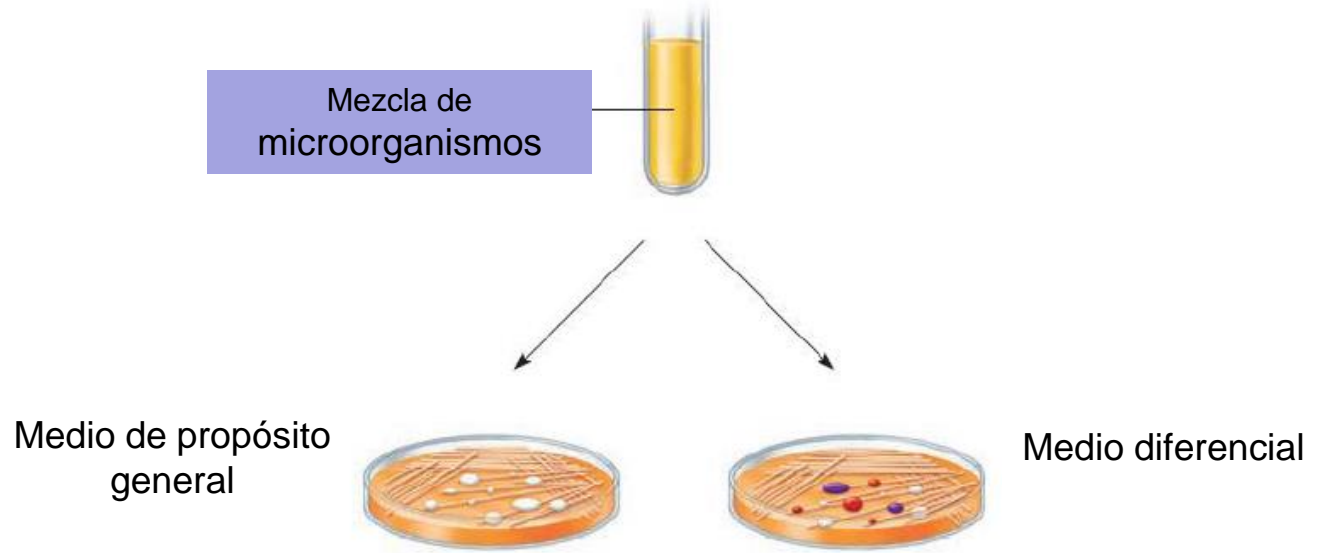


Esquema para la diferenciación de Cocos y Cocobacilos Gram- negativos



Clasificación de medios de cultivo

Medios diferenciales usados en pruebas metabólicas con microorganismos puros

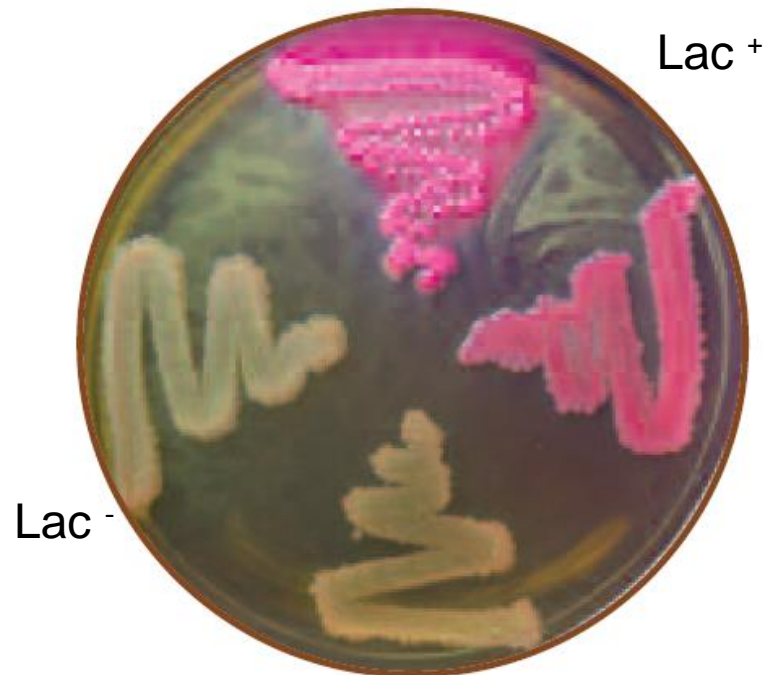


Medio	Agente que facilita direnciación	Para diferenciar
Manitol salado	Manitol y rojo fenol	<i>Staphylococcus aureus</i>
Mac Conkey	Lactosa y rojo neutro	Enterobacterias que fermentan la lactosa y bajan el pH
Agar sangre	Globulos rojos intactos	Distinto tipo de hemólisis
SIM	Tiosulfato y hierro	Productores de H ₂ S, movilidad y producción de indol

Caracterizaciones metabólicas

Metabolismo de Lactosa: Medio Agar Mac Conkey

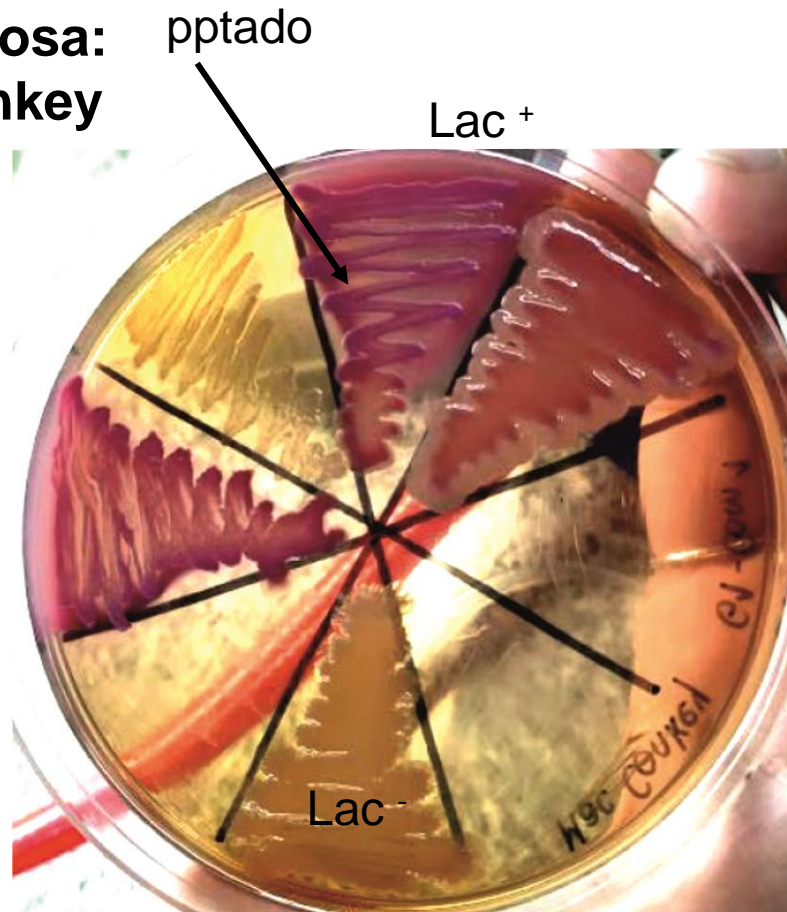
Fórmula (en gramos por litro)	
Peptona	17.0
Pluripeptona	3.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Agar	13.5
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.001



<https://www.youtube.com/watch?v=yInQ9jApAlU>

Caracterizaciones metabólicas

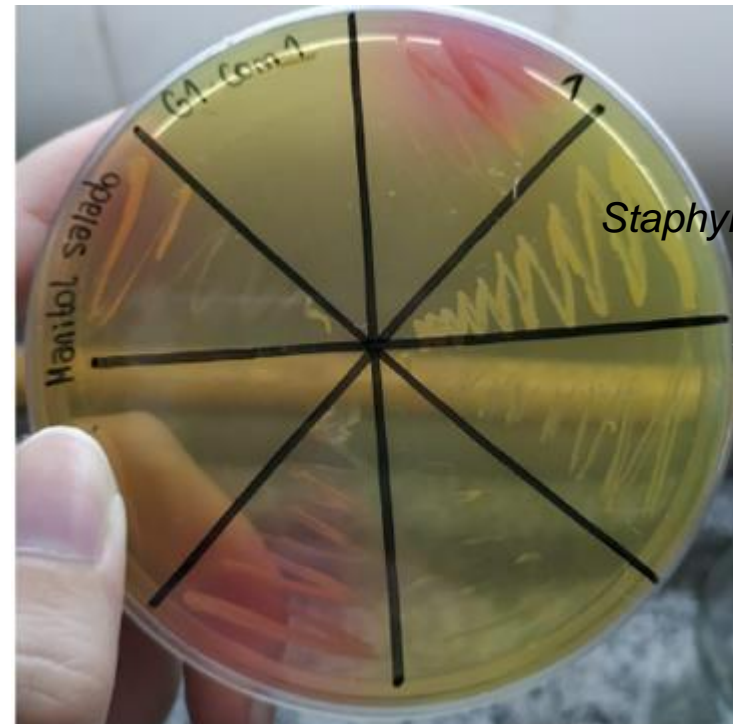
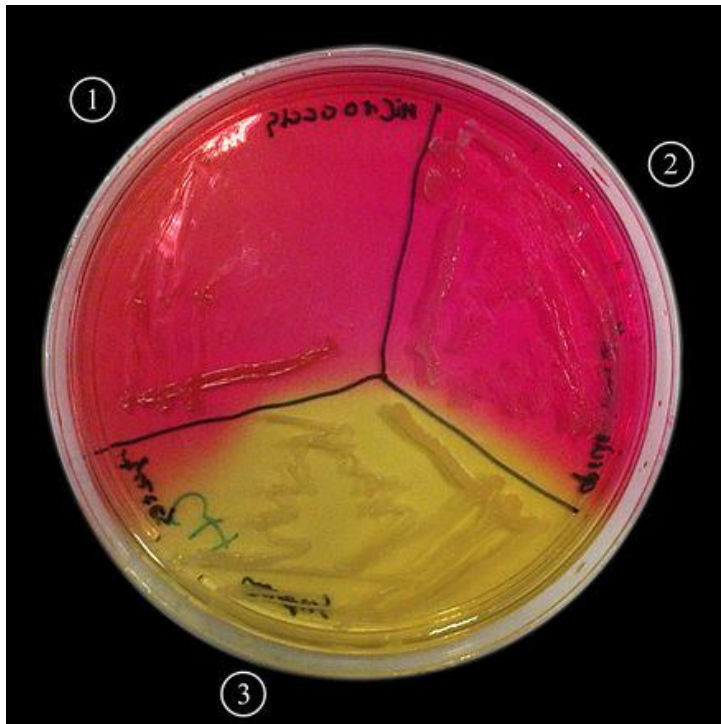
Metabolismo de lactosa:
Medio Agar Mac Conkey



Caracterizaciones metabólicas

Metabolismo de Manitol: Medio Agar Manitol Salado

Staphylococcus
Manitol -



Staphylococcus
Manitol+

https://www.youtube.com/watch?v=kG1_Tf5Vpc0

Caracterizaciones metabólicas

Pruebas de movilidad, metabolismo del azufre y triptófano: Medio SIM

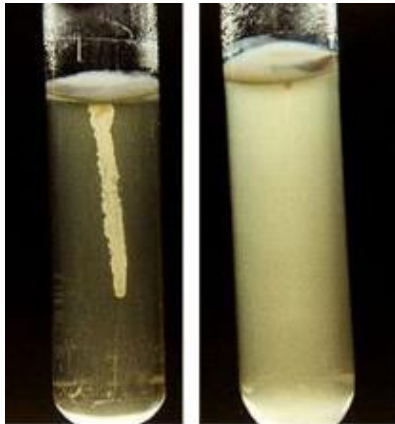
Fórmula (en gramos por litro)	
Tripteína	20.0
Peptona	6.1
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5

A)



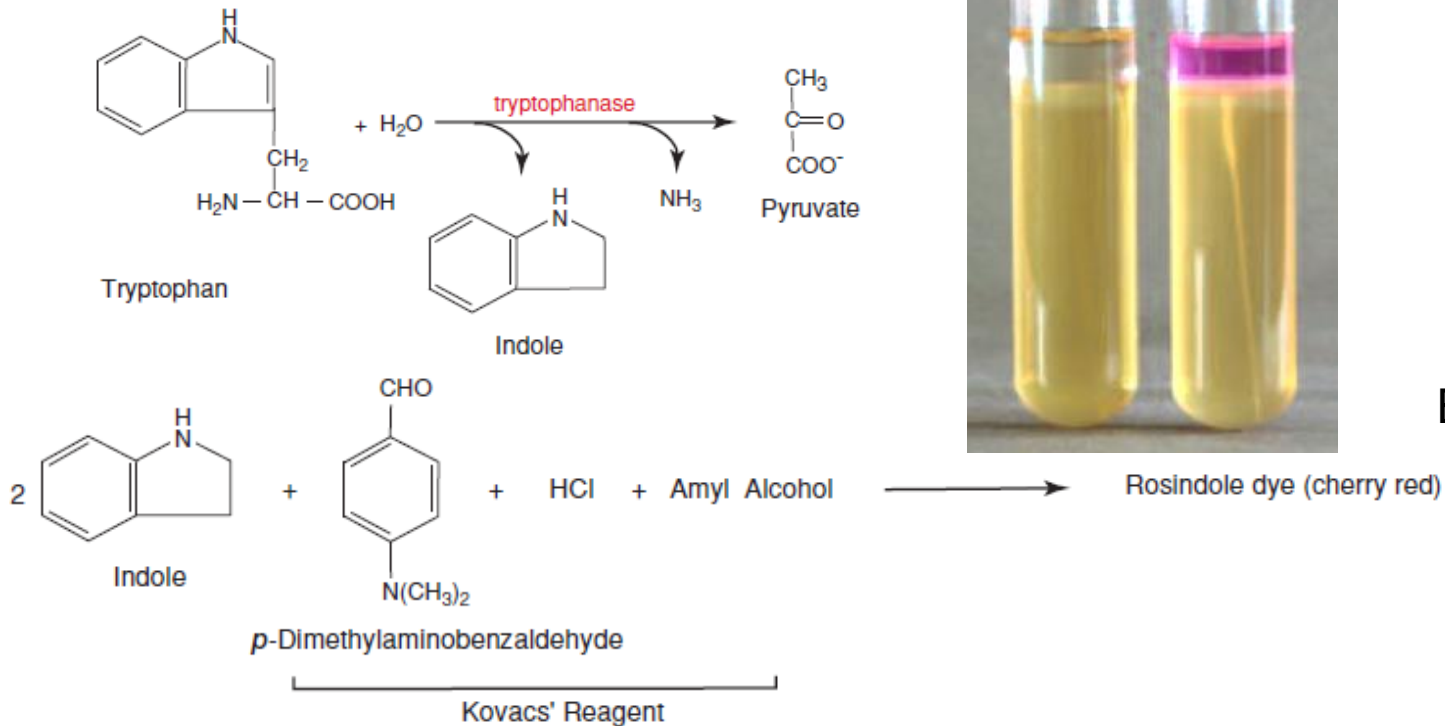
- 1- Sin inocular
- 2- No movil
- 3- Movil
- 4- Productora de H_2S

B)



Caracterizaciones metabólicas

Medio SIM



A)



B)

1

2



<https://www.youtube.com/watch?v=u9cX8mZoh88>

Caracterizaciones metabólicas

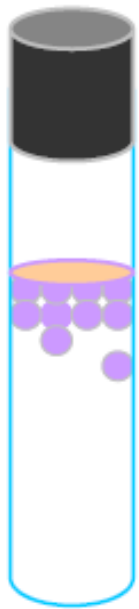
Caldo Tioglicolato.

Fórmula (en gramos por litro)	
Tripteína	17.0
Peptona de soya	3.0
Glucosa	6.0
Cloruro de sodio	2.5
Tioglicolato de sodio	0.5
Agar	0.7
L-cistina	0.25
Sulfito de sodio	0.1

Caracterizaciones metabólicas

Oxigenación

Crecimiento en medio fluido de Tioglicolato.



Aerobio obligado



Aerobio facultativo



Microaerofilico



Anaerobio aerotolerante

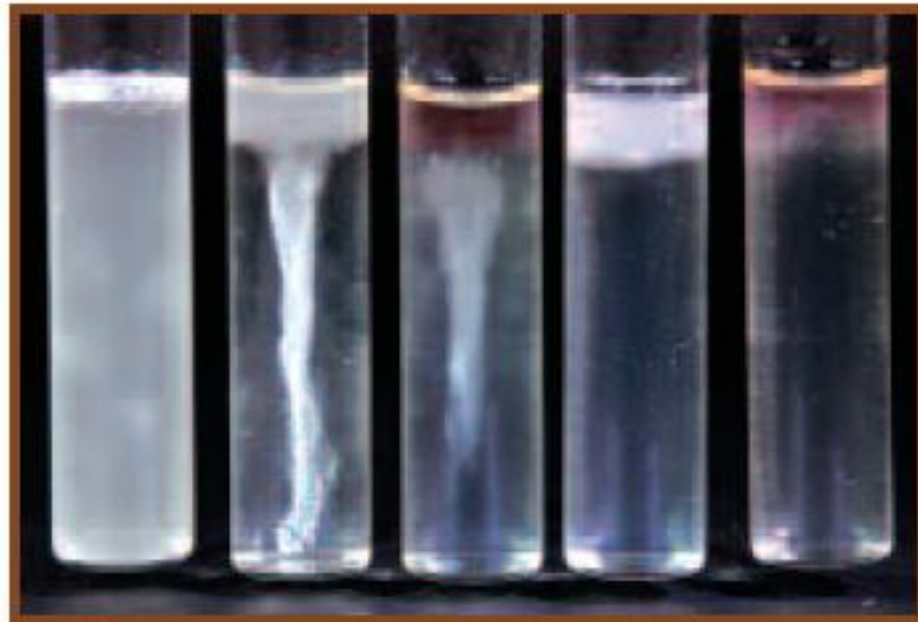


Anaerobio obligado

Caracterizaciones metabólicas

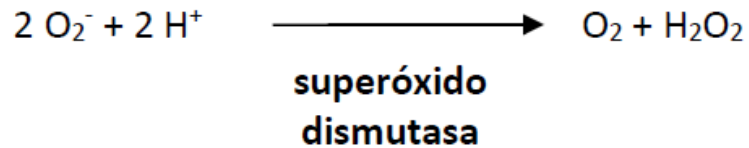


3-42 AEROBIC ZONE IN THIOGLYCOLLATE MEDIUM Note the pink region in the top (oxidized) portion of the broth. The bottom (reduced) portion of the medium remains colorless.



3-43 GROWTH PATTERNS IN THIOGLYCOLLATE MEDIUM Growth patterns of a variety of organisms are shown in these Fluid Thioglycollate Broths. Pictured from left to right are: aerotolerant anaerobe, facultative anaerobe, strict anaerobe, strict aerobe, and microaerophile. Compare these tubes with the uninoculated broth in Figure 3-42.

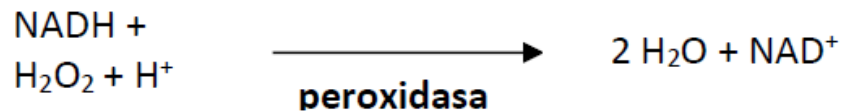
Caracterizaciones metabólicas



En los aerobios, anaerobios
aerotolerantes y facultativos.
No se encuentra en los
anaerobios estrictos

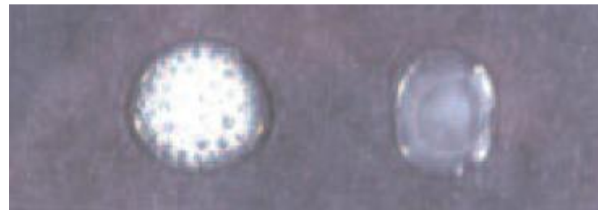


Aerobios y facultativos



Aerotolerantes (y no tienen
catalasa)

Test de catalasa con H_2O_2

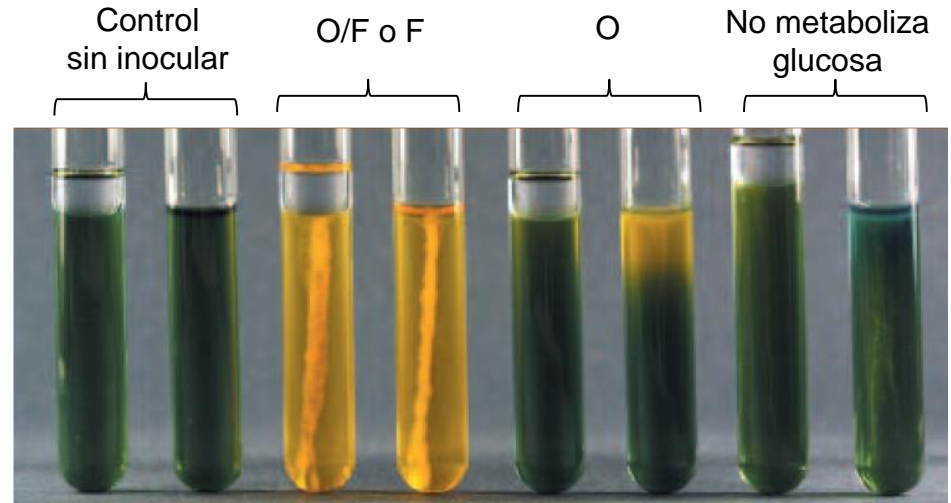


<https://www.youtube.com/watch?v=SBmL2vg-INO>

Fermentación vs respiración

Fermentación/respiración de azúcares: Medio OF

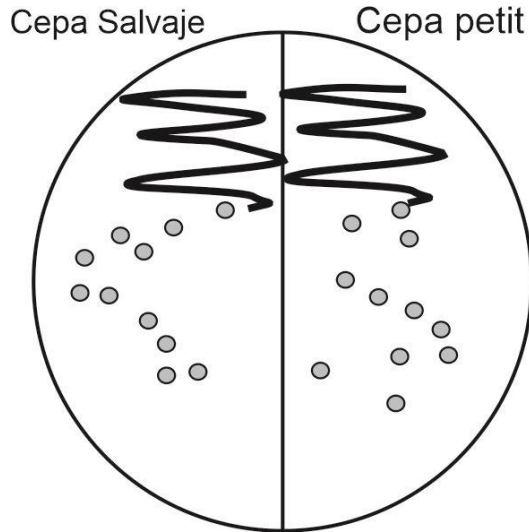
Fórmula (en gramos por litro)	
Caseína pancreática	2.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
Azul de bromotimol	0.03 g
Agar	2.5 g



Reacción	Tubo con reacción positiva	Tubo abierto	Tubo sellado
Oxidación	Abierto	Amarillo (+)	Verde (-)
Fermentación	Sellado	Amarillo (±)	Amarillo
Ni fermentación, ni oxidación	Ninguno	Azul o verde	Verde
Fermentación y oxidación	Ambos	Amarillo	Amarillo

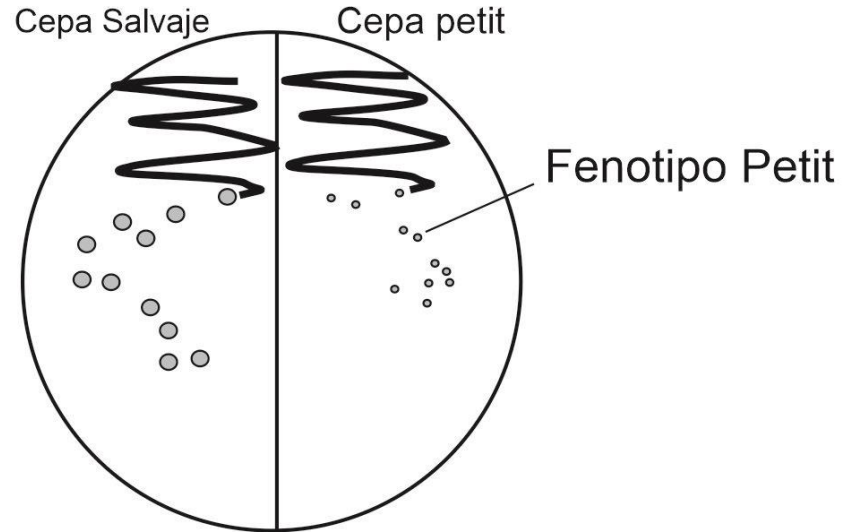
<https://www.youtube.com/watch?v=8c5FGTvaKcE>

Oxidación/Fermentación en *S. cerevisiae*



Medio YPD agar

1 % extracto de levadura,
2 % peptona,
1 % glucosa,
2 % agar)



Medio YPG agar (+ 0,1% Glucosa)

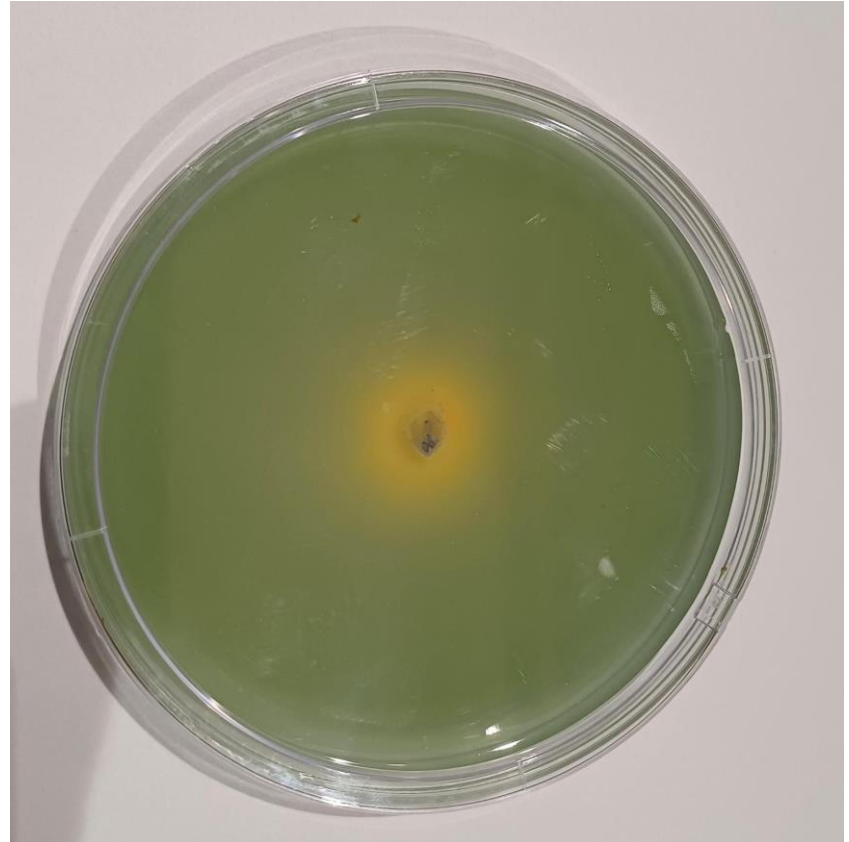
1 % extracto de levadura,
2 % peptona,
3 % Glicerol,
2 % agar
0,1 % Glucosa

Caracterizaciones metabólicas

Producción de ácidos orgánicos.

e.g. Penicillium bilaiae solubilizador de fósforo

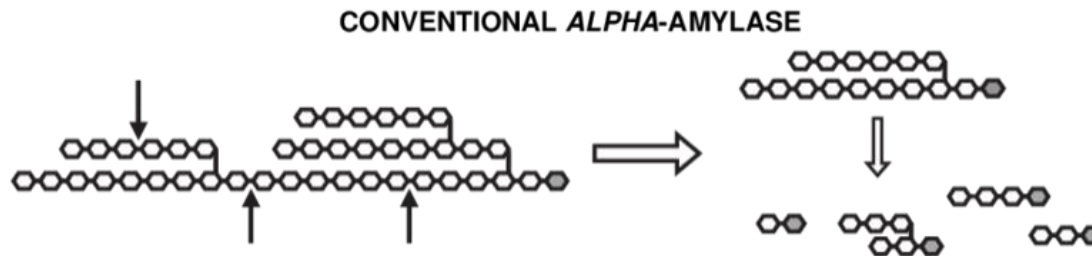
La producción de ácidos orgánicos viran el indicador y se observa un halo claro alrededor de la cepa en estudio cultivada en medio Pikovskaya agar



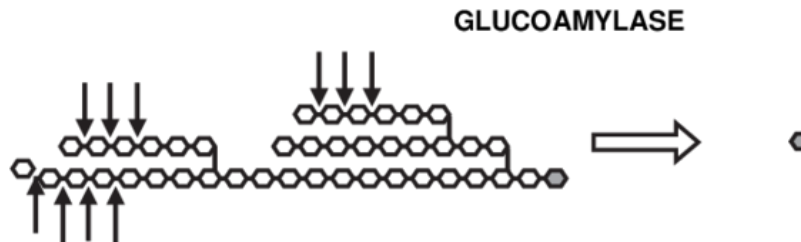
Amilasas

- Amilasas en industria alimentaria: Modificación de la estructura del almidón/azúcares

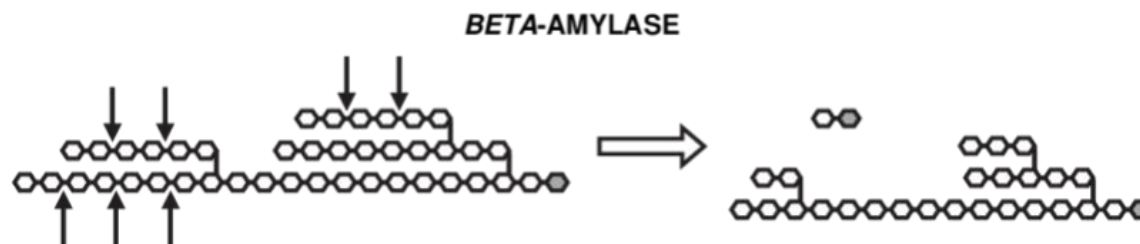
- Reacción de clarificación: alfa-amilasa (generación de dextrinas)



- Sacarificación: glucoamilasa (generación de glucosa)



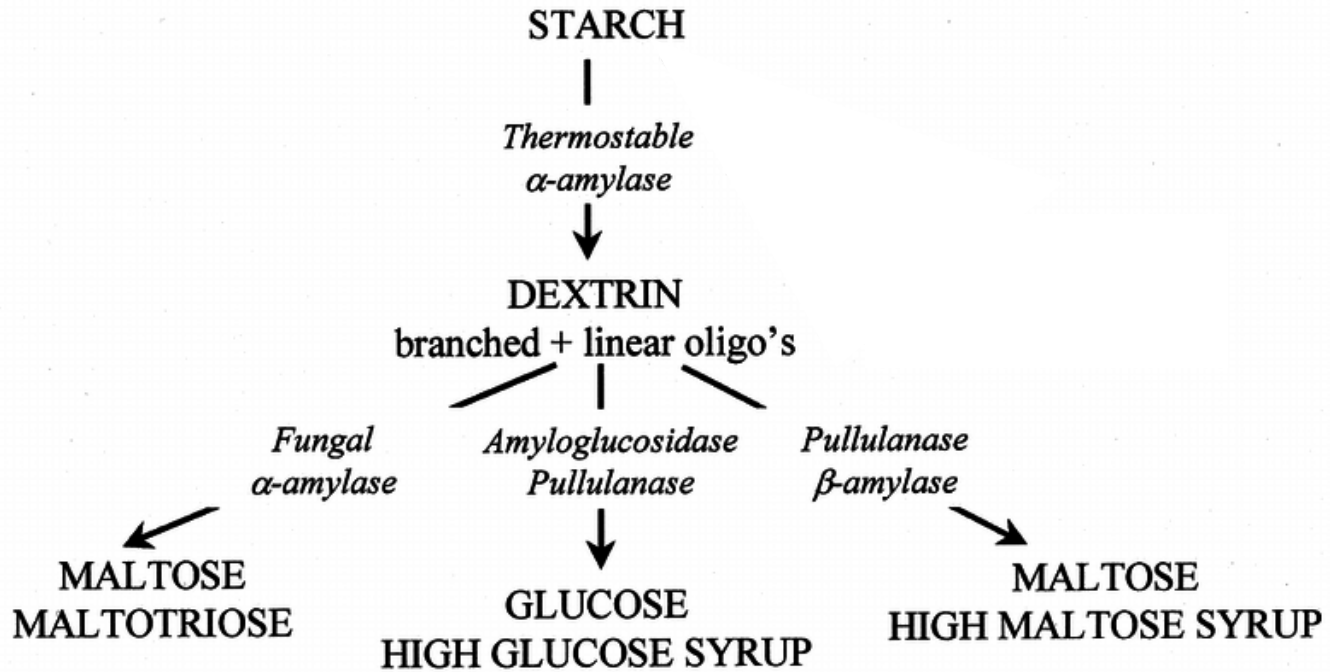
- Sacarificación: Beta-amilasa (generación de maltosa)



Amilastas

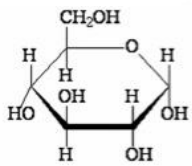
Liquefaction

Saccharification

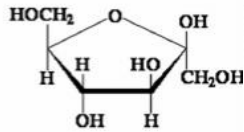


Glucose isomerase

Crystallization



Glucose



Fructose

FRUCTOSE SYRUP

CRYSTALLINE SUGAR

Proteasas y Amilasas

- Uso en detergentes con poder enzimático:
 - Proteasas
 - Amilasas
 - Lipasas

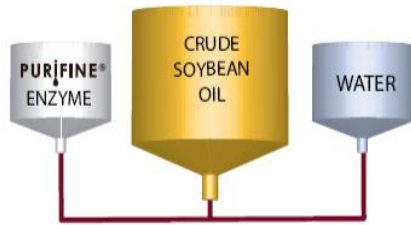


Estas enzimas son agregadas a la formulación del detergente con el fin de degradar proteínas, azúcares y lípidos para facilitar su solubilización y remoción.

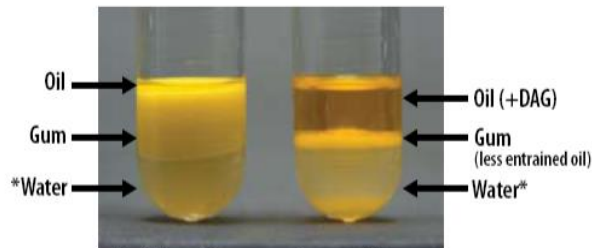
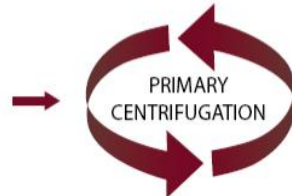
Fosfolipasas

Un uso importante de fosfolipasas (principalmente PLA y PLC) es en el proceso de remoción de fosfolípidos del aceite crudo denominado “odegomado”

An Alternative Degumming Process



Required for efficient enzyme reaction



Traditional Process: No Enzyme Improved Process: PURIFINE® Enzyme

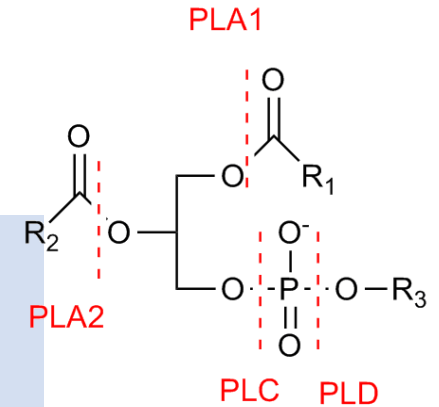
*Excess water used for demonstration only

Purifine® Enzyme Yield

Total Yield Benefit:

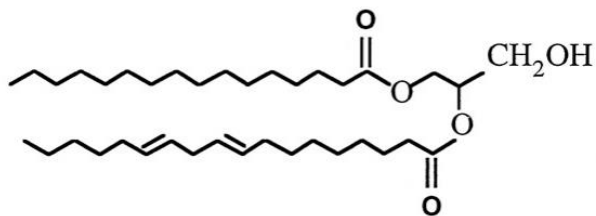
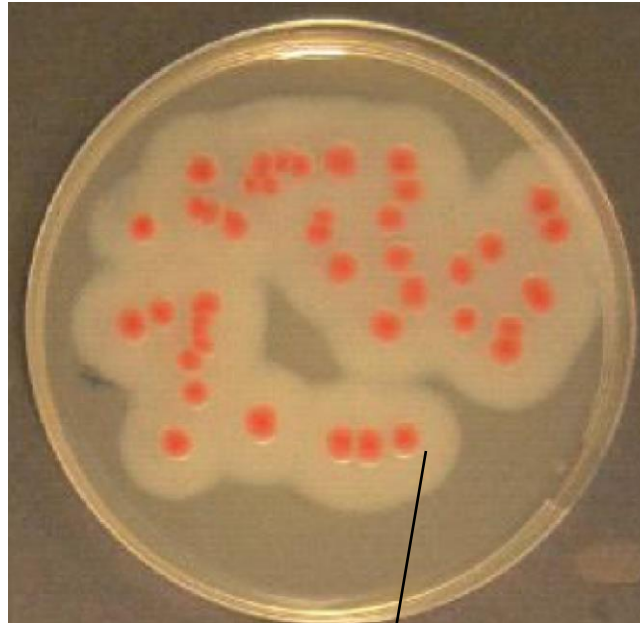
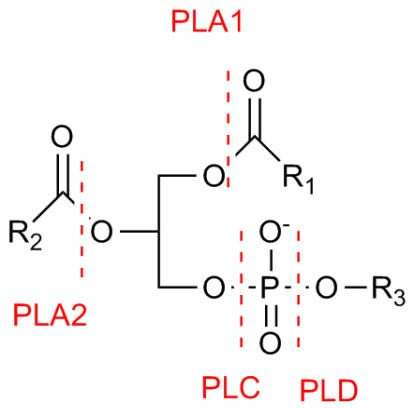
~ 60% DAG (from phospholipid)

~ 40% TAG (from reduced entrainment)



Test fosfolipasas

Test de Fosfolipasa C (PLC)
LBA - Yema de huevo



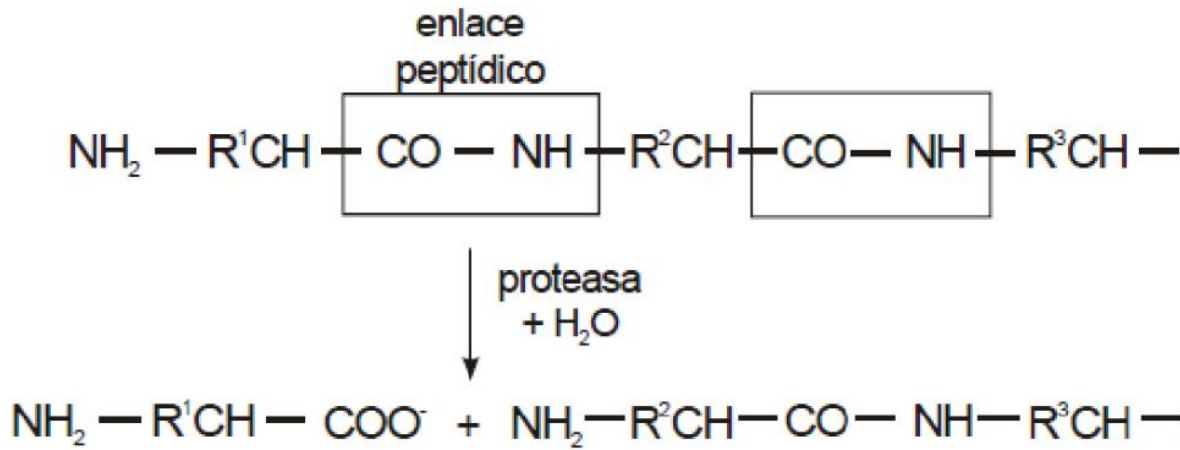
Diacilglicerol
(insoluble)

Resultado positivo

Resultado negativo

Test proteasas

Test de Proteasas LBA - Leche



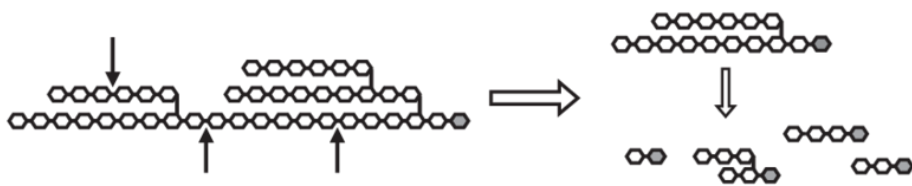
Halo claro = degradación de caseína

Test amilasas

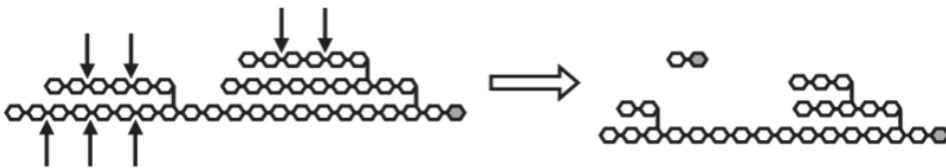
- Siembra en medio de cultivo sólido
- Incubación para permitir el crecimiento
- Agregado de Lugol para evidenciar la presencia de almidón

Tinción con Lugol

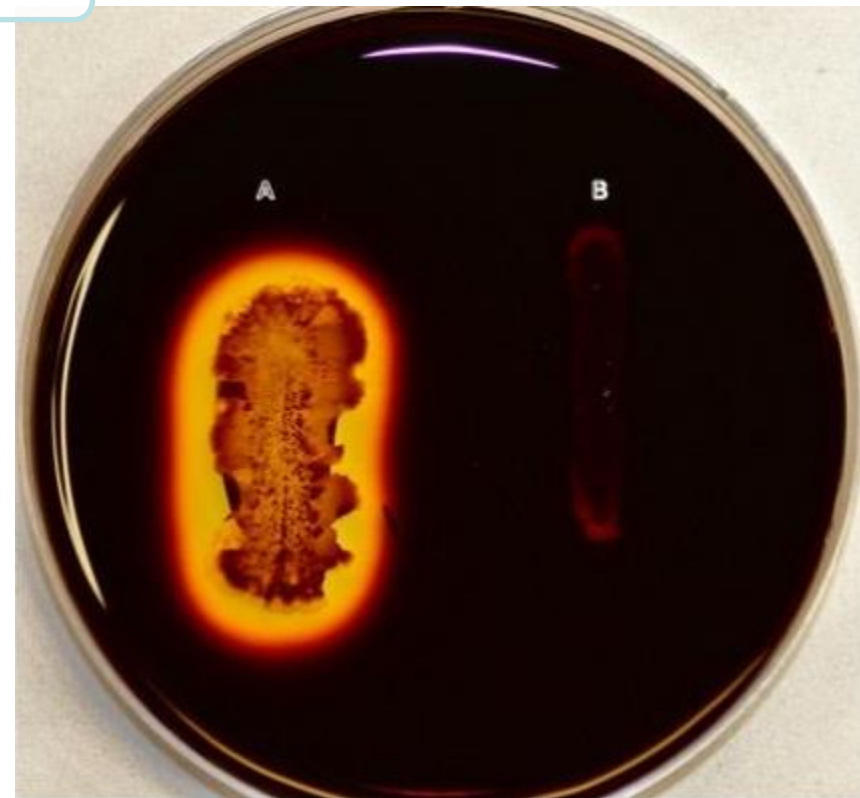
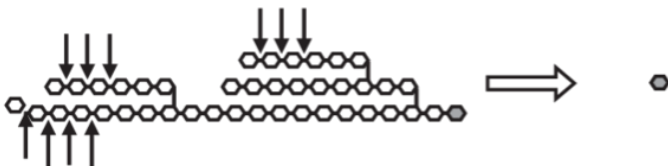
CONVENTIONAL ALPHA-AMYLASE



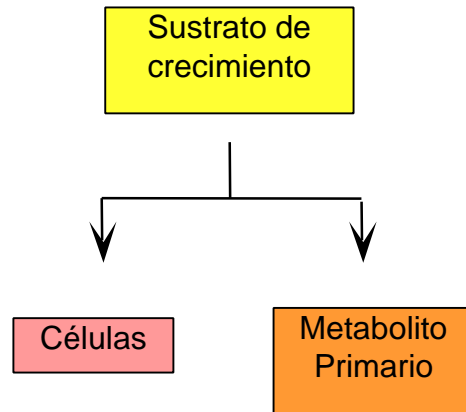
BETA-AMYLASE



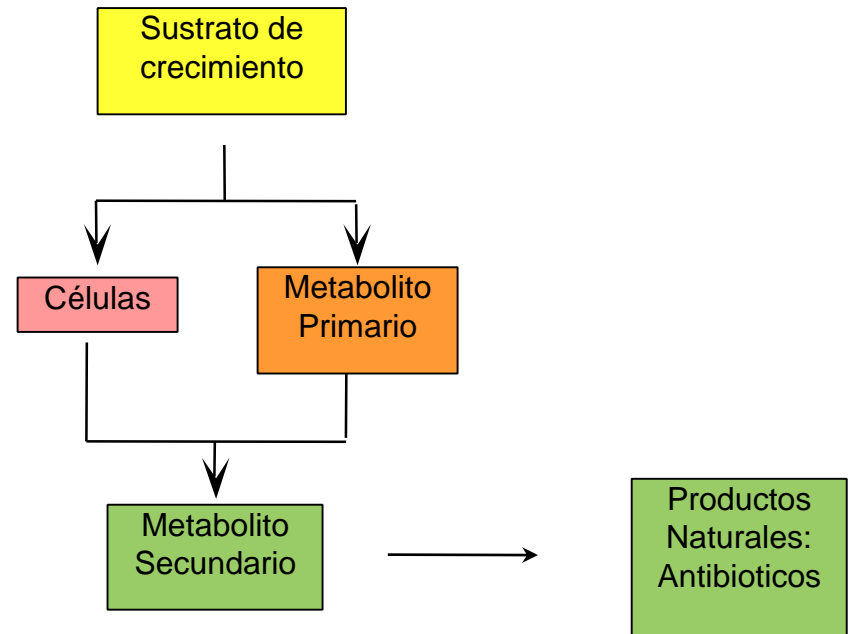
GLUCOAMYLASE



Metabolitos Primarios y Secundarios



Las células y el metabolito se producen más o menos simultáneamente



Después de producidas las células y el metabolito primario, las células convierten el metabolito primario en uno secundario

Género *Streptomyces*

Producen 55% ATB de uso medicinal
Incluyen: Policetónicos Macrólidos y Aromáticos, Peptidos de Síntesis no Ribosomal, β -lactámicos, Policetónico-NRPS híbridos, Cumarinas y Polipirroles.

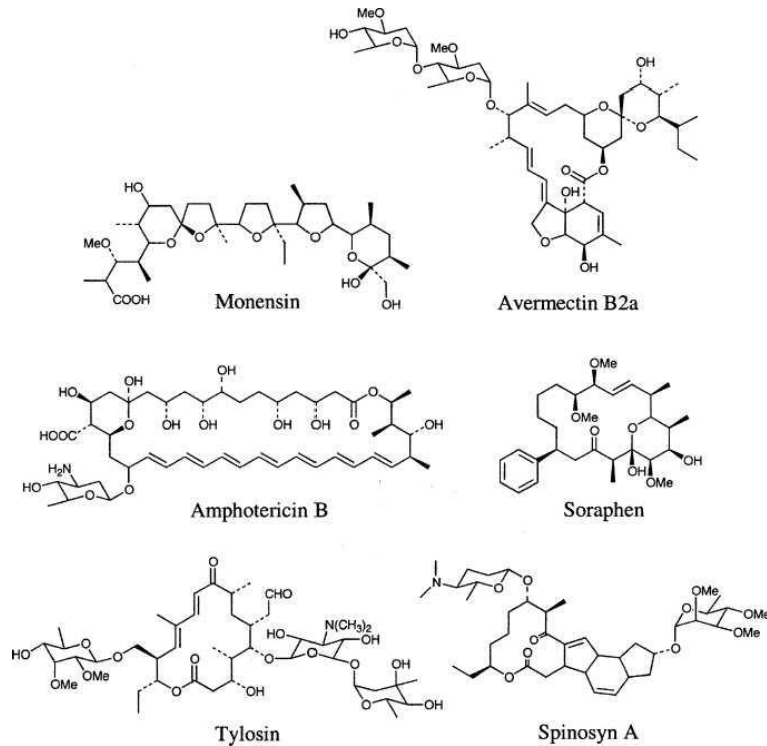


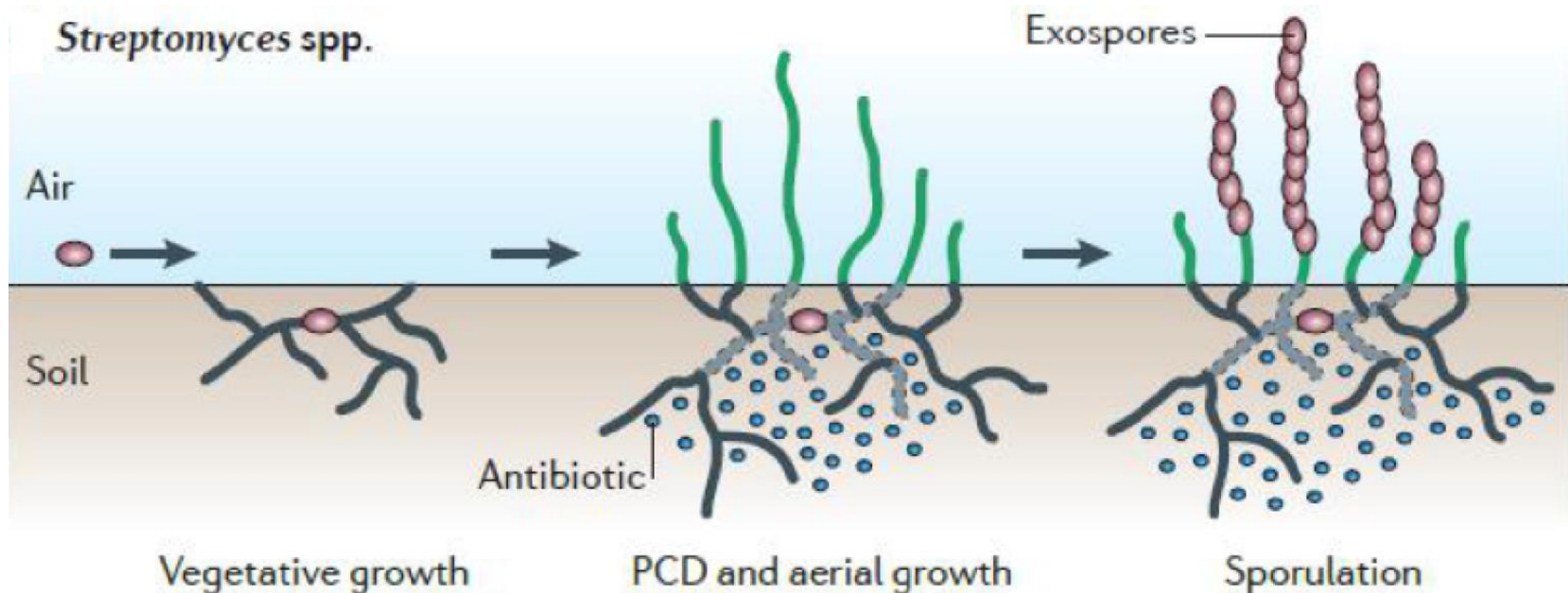
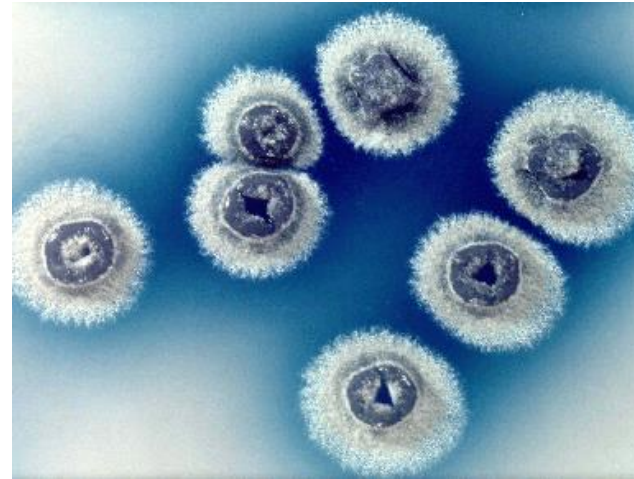
Table 11.1 Selected actinomycete antibiotics

Antibiotic	Producer	Class ¹	Target ²	Application
Avermectin	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Macrolide(PK)	Chloride ion channels	Antiparasitic
Bleomycin	" <i>Streptomyces verticillus</i> "	Glycopeptide	DNA strand breakage	Antitumor
Chloramphenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	<i>N</i> -dichloroacyl phenylpropanoid	Ribosome binding	Antibacterial
Chlorotetracycline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Tetracycline (PK)	Ribosome binding	Antibacterial
Clavulanic acid	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	β -lactam	β -Lactamase inhibitor	Combined with β -lactam as antibacterial
Daptomycin	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Lipopeptide	Lipoteichoic acid?	Antibacterial
Daunorubicin (daunomycin)	<i>Streptomyces peucetius</i>	Anthracycline (PK)	DNA intercalation	Antitumor
Erythromycin	<i>Saccharomyces erythraea</i>	Macrolide (PK)	Ribosome binding	Antibacterial
FK506 (tacrolimus)	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Macrolide (PK)	Binds to FK protein	Immunosuppressant
Fosfomicin	<i>Streptomyces</i> spp.	Phosphonic acid	Peptidoglycan	Antibacterial
Gentamicin	<i>Micromonospora</i> spp.	Aminoglycoside	Ribosome binding	Antibacterial
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Aminoglycoside	Ribosome binding	Antibacterial
Mitomycin C	" <i>S. caespitosus</i> ," " <i>S. verticillatus</i> "	Benzoquinone	DNA cross-linking	Antitumor
Nocardicin	<i>Nocardia uniformis</i>	β -Lactam	Peptidoglycan	Antibacterial
Nosiheptide	" <i>S. actuosus</i> "	Thiopeptide	Ribosome binding	Growth promoter
Novobiocin	<i>Streptomyces niveus</i>	Coumarin glycoside	DNA gyrase (β subunit)	Antibacterial
Oleandomycin	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Macrolide (PK)	Ribosome binding	Antibacterial
Oxytetracycline	<i>Streptomyces rimosus</i>	Tetracycline (PK)	Ribosome binding	Antibacterial
Pristinamycin	" <i>S. pristinaespiralis</i> "	Peptidic macrolactone + polyunsaturated macrolactone (PK)	Ribosome binding	Antibacterial
Rifamycin	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Ansamycin (PK)	RNA polymerase	Antibacterial (tuberculosis and leprosy)
Teicoplanin	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	Glycopeptide	Peptidoglycan	Antibacterial

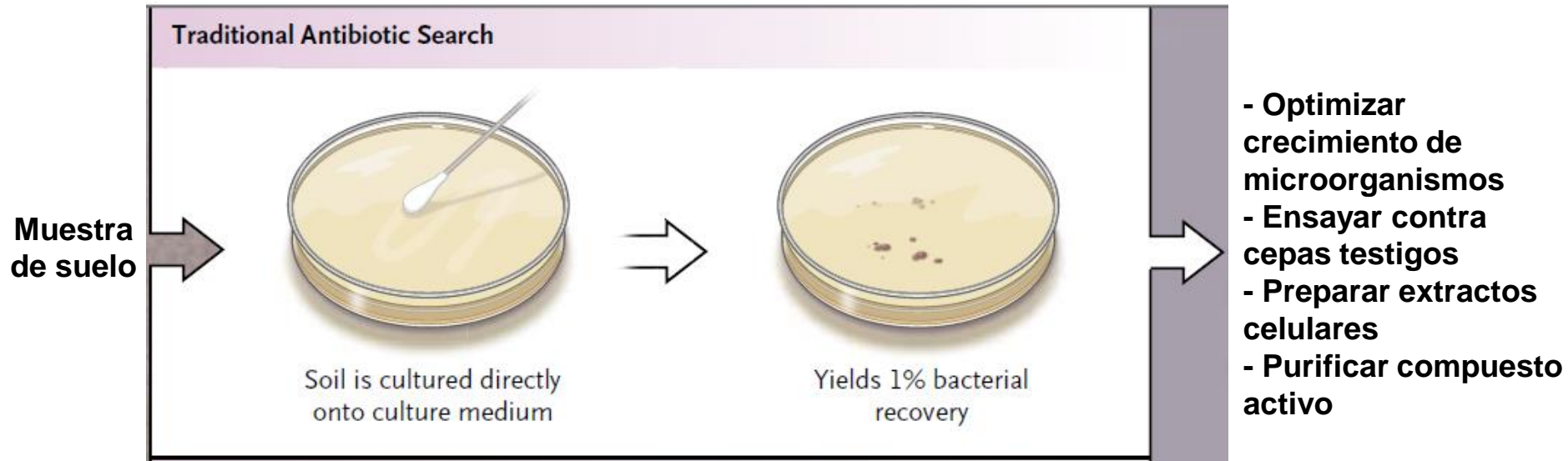
Aislamiento Microorganismos de la Naturaleza: Identificación de características macroscópicas

Streptomyces coelicolor

- Colonias secas
- Adheridas al agar
- Pigmentación
- Formación de esporas



Método tradicional de Aislamiento de Productores de Productos Naturales



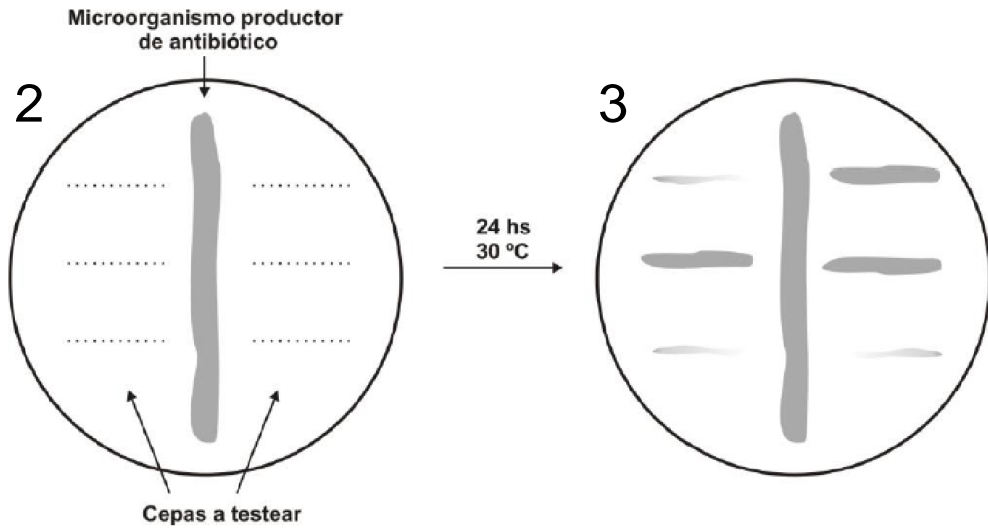
Ver animación Brock: Aislamiento de productores de antibióticos

TP 2B (Dia 4)

Producción de Antibióticos

- Test de inhibición en estría

1



- Test de difusión en agar

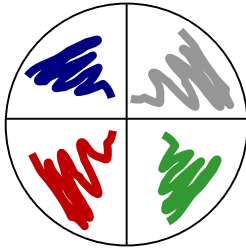
4



TP 2B (Dia 4)

Producción de Exoenzimas

- Producción de amilasas
- Producción de proteasas
- Producción de lipasas



DÍA 5: Análisis de los resultados

Ensayo	Suelo (1)	Suelo (2)	Agua (enterobacteria)	Agua (pseudomonas)	Ricota (staphylococcus)	Alimento	Controles
Mac Conkey							
Manitol salado							
SIM							
Tioglicolato							
O/F							
Catalasa							
Amilasa							
Proteasa							
Lecitinasa							
Producción de antibióticos							
Gram							

Guía de Preguntas. TP 2- B

- 1) En la siguiente lista de sustancias, indique cuáles de ellas pueden servir como dadores de electrones y cuales pueden servir como aceptores de electrones: Fe^{2+} , O_2 , CO_2 , NH_4^+ , SO_4^{2-} , NO_3^- , NO_2^- , H_2S , glucosa, CH_4 , Fe^{3+}
- 2) En un experimento fue aislada una mutante de un organismo que tiene bloqueado el paso de acetaldehído a etanol. Este organismo no es capaz de crecer mucho tiempo anaeróbicamente, pero sí puede crecer si está el O_2 presente. Dé una explicación bioquímica posible para esta observación.
- 3) En la respiración anaeróbica el NO_3^- puede servir como aceptor de electrones. ¿A qué es convertido?
- 5) Explique el propósito de incorporar azul de bromotimol al medio utilizado para estudiar oxidación-fermentación.
- 6) ¿Cuál es la función de la sal ferrosa en el medio de SIM? ¿De dónde proviene el H_2S formado en este medio?
- 7) ¿Qué otra enzima además de la catalasa degrada al H_2O_2 ? ¿Qué microorganismos producen estas enzimas?
- 8) Explique el efecto tóxico del O_2 en los anaerobios estrictos.
- 9) La enterobacteria *Salmonella entérica* posee la enzima tiosulfato reductasa que le permite respirar tiosulfato. Además, posee movilidad, es incapaz de metabolizar lactosa aunque puede crecer a partir de triptofano. Que resultados espera obtener si esta bacteria es cultivada en medios SIM y Agar Mac Conkey.

- 10) ¿Cuáles son las diferencias morfológicas (de las células y de las colonias) entre los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*?
- 11) ¿Qué ventajas le confiere la producción de “estados de arresto” (por ejemplo, endosporas por *Bacillus*, exosporas por *Streptomyces*, cistos por *Azotobacter*) en el suelo?
- 12) ¿Qué ventajas confiere la producción de antibióticos en el suelo?
- 13) ¿Qué ventajas confiere la fijación de nitrógeno atmosférico?
- 14) ¿Cuál es el objetivo de realizar el shock térmico durante el aislamiento de bacterias del suelo?
- 15) ¿Podría diseñar un medio de cultivo que le permita aislar todos los microorganismos del suelo de una sola vez?
- 16) Algunas especies de *Klebsiella* pueden fijar nitrógeno, pero no lo pueden hacer cuando esta crece aeróbicamente. ¿Cuál es la razón para esto?
- 17) ¿Qué tipo de microorganismos espera encontrar en una muestra de suelo seco como fuente de inóculo?
- 18) ¿Qué tipo de microorganismo utilizaría como "testigo" para detectar bacterias de suelo productoras de antibióticos β -lactámicos? ¿Podría utilizar *Saccharomyces cerevisiae*?
- 19) ¿Qué ventaja representa para los microorganismos tener exoenzimas?
- 20) ¿Por qué los polisacáridos tales como almidón y glucógeno deben ser digeridos fuera de la célula y los disacáridos como sacarosa y lactosa pueden ser digeridos dentro de ella?