FACTORES FISICOS Y QUIMICOS QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO MICROBIANO

1.- E L O X I G E N O.

Atendiendo a los requerimientos de oxígeno, los microorganismos han sido clasificados en varias categorias, las cuales indican el mecanismo empleado para satisfacer su necesidades energéticas. Estos grupos son:

I.- **AEROBIOS ESTRICTOS u OBLIGADOS:** Son aquellos organismos que requieren de oxígeno molecular para su crecimiento, el cual lo emplean como aceptor final de electrones en sus cadenas respiratorias generadoras de de energía, pues este es el único mecanismo de que disponen para ello. Dentro de este grupo se incluyen las siguientes especies entre otras:

Bacterias nitrificantes
Bacterias oxidadoras del fierro
Bacterias oxidadoras del azufre
Bacterias oxidadoras del hidrógeno
Bacilos esporuladores
Mycobacterium
Nocardia

II.-**ANAEROBIOS ESTRICTOS u OBLIGADOS:** Son aquellos microorganismos que solo son capaces de crecer en ausencia de oxígeno. Dadas las condiciones fuertemente reductores que prefieren, disponen de reacciones que no involucran al oxigeno molecular como aceptor de electrones sino a compuestos orgánicos o inorgánicos diferentes y mediante ellas se abastecen de energía . Algunos de los microorganismos incluidos dentro de esta categoria se encuentran:

Bacterias desnitrificantes
Bacterias desasimiladoras de los sulfatos: Desulphovibrio
Clostridium pasteurianum
Clostridium acetobutyricum
Treponema pallidum
Clostridum tetani
Bacterias metanogénicas

III.-**ANAEROBIOS FACULTATIVOS**; son aquellos microorganismos que tienen la habilidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno molecular. Cuando está disponible utilizan al oxígeno como aceptor final de electrones, pero cuando no hay, obtienen su energía mediante reacciones fermentativas. Entre estos organismos se incluyen:

Bacterias del ácido láctico: Streptococcus, Leuconostoc
Pediococcus, Lactobacillus

Staphylococcus
Corynebacterium
Pseudomonas aeruginosa
Streptococcus pyogenes
Streptococcus faecalis
Butyribacterium rett-geri
Zymomonas
Levaduras y coliformes

IV.-**MICROAEROFILICOS:** Son organismos aeróbicos que requieren muy bajas tensiones parciales de oxígeno para su crecimiento, pero son incapaces de crecer a la presión atmosférica de oxígeno o en su ausencia. Esto indica que estos organismos poseen enzimas que son inactivadas bajo condiciones ocidantes fuertes y se mantienen funcionales solamente a bajas presiones parciales de oxígeno. Estos suelen crecer en aguas contaminadas, mientras que otros son patógenos para humanos, entre ellos se pueden citar los siguientes.

Sphaerotilus natans: crece en aguas contaminadas
Legionella
Listeria
Erysipelothrix
Campylobacter
Hydrogenomonas
} : patógenos para humanos y animales

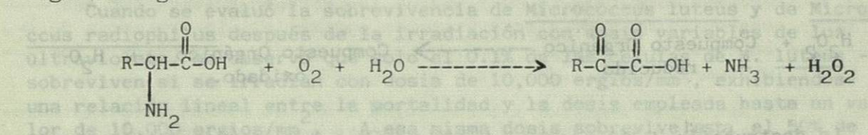
V.-**AEROTOLERANTES:** Son organismos anaerobios que no mueren por exposición al oxígeno. Entre estos podemos mencionar a:

Butyribacterium rettgeri
Streptococcus faecalis
Streptococcus lactis

El oxígeno es requerido por los microorganismos aeróbicos para dos propósitos, como **aceptor final de electrones** en sus cadenas respiratorias y una muy pequeña cantidad de oxígeno molecular es requerido como sustrato en ciertas reacciones enzimáticas catalizadas por **OXIGENASAS**, por ejemplo las oxigenasas que participan en la degradación del catecol y otros compuestos aromáticos por organismos pseudomonadales. Otras oxigenasas intervienen en la síntesis de esteroles y acidos grasos insaturados como ocurre en las levaduras.

El oxígeno puede ser tóxico aún para los aerobios estrictos cuando es abastecido a una presión más alta que la atmosférica (20% O_2 vol/vol). Los organismos anaeróbicos son usualmente muy sensibles al oxígeno, aunque unos pocos son aerotolerantes, en cambio los anaerobios estrictos mueren por exposición al oxígeno.

La toxicidad del oxígeno resulta de la formación de productos tóxicos en reacciones enzimáticas que involucran al oxígeno. Las flavoproteinas como la **D-aminoacido oxidasa** forma el producto tóxico: **peróxido de hidrógeno** según la siguiente reacción:



En reacciones enzimáticas que involucran al oxígeno tambien se generan pequeñas cantidades de productos aún más tóxicos como son el anión llamado **SUPEROXIDO** ($O_2^{\cdot -}$) y los productos formados a partir de él como son el **oxigeno singulete** ($^1O_2$) y el **radical libre hidroxilo** ($OH^{\cdot}$) que son altamen

te tóxicos y reactivos.

Los microorganismos que son capaces de crecer en presencia de oxígeno y forman enzimas que destruyen estos productos tóxicos; los aerobios y los aerotolerantes forman la enzima **SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)** que cataliza la reducción del superoxido a peróxido de hidrógeno y previene así la formación de más productos tóxicos com los señalados anteriormente, la reacción de reducción es la siguiente:

$$2\,O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$$

En Escherichia coli se han descrito tres distintas superoxido dismutasas, una es constitutiva y está presente en niveles similares tanto en condiciones aeróbicas como aneróbicas; mientras que las otras dos aparecen solo durante el crecimiento aeróbico. Las tres enzimas mencionadas se designan abreviadamente anotanto el simbolo del metal que tienen asociado, por ejemplo: Fe-SOD, Mn-SOD y Fe-Mn-SOD.

Los organismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos forman tambien una segunda enzima, la **CATALASA** que descompone el peroxido de hidrógeno de la siguiente manera:

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{CATALASA} O_2 + 2\,H_2O$$

La relación SOD/catalasa en Escherichia coli es de 1.5 y para vibrios halofílicos como Vibrio parahaemolyticus, Vibrio alginolyticus y Vibrio cholerae varia en un rango de 0.9 a 2.1.

Un grupo bacteriano capaz de crecer en presencia de oxígeno son las bacterias del ácido láctico, las cuales no forman catalasa; sin embargo estos organismos son capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno por un mecanismo diferente que involucra enzimas conocidas como **PEROXIDASAS**, estas catalizan la reduccióndel peróxido de hidrógeno pero empleando compuestos orgánicos según mostramos enseguida:

$$H_2O_2 + \text{Compuesto Orgánico reducido} \longrightarrow \text{Compuesto Orgánico oxidado.} + H_2O$$

La destrucción del agente oxidante (H_2O_2) permite que el microorganismo pueda crecer en presencia de oxígeno aunque carezca de catalasa.

2.- R A D I A C I O N E S

Las radiaciones muestran también un efecto dañino sobre los microorganismos, aunque en diferente grado según el organismo y la longitud de onda de la radiación que recibe. Enseguida mencionamos los efectos que cada una de ellas opera sobre los microorganismos.

I.- **RADIACION ULTRAVIOLETA (100-300 nm):** Su efecto letal máximo ocurre a 260 nm que es precisamente la longitud de onda a la cual absorben las bases púricas y pirimídicas del DNA. Los daños que esta radiación ocasiona sobre el DNA incluyen un amplio espectro de mutaciones debido a sustituciones de bases así como delesiones, induce rupturas endonucleolíticas de las cadenas polinuclotidas, uniones entrecruzadas entre las dos cadenas polinucleótidas, enlaces entre el DNA y proteínas, y dímeros de pirimidinas siendo éstos los que más usualmente se forman. tales fotoproductos se ilustran en la figura 1.

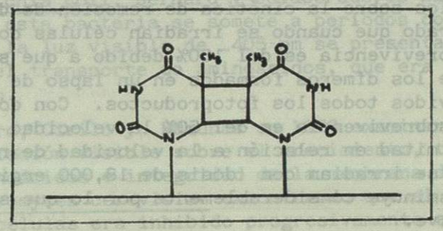


Fig.1. Estructura de un dímero de timina.

La sensibilidad de los microorganismos a la luz ultravioleta resulta de la incapacidad de las células para hacerle frente a los daños causados en su DNA. Sin embargo, algunos microorganismos si son capaces de sobrevivir porque presentan mecanismos reparadores los que podemos mencionar a la **fotoreactivación, remoción de lesiones en la oscuridad y recombinación entre cromátides hermanas.** En un mismo organismo pueden operar uno o más al mismo tiempo.

Hay varias especies de Micrococcus altamente resistentes a la radiacion ultravioleta, Micrococcus radiodurans remueve rapidamente los dímeros de timina y tiene también un alto nivel de resistencia a los rayos X. Micrococcus radiophilus es más resistente que M. radiodurans tanto a la radiación ultravioleta como a los rayos X.

Cuando se evaluó la sobrevivencia de Micrococcus luteus y de Micrococcus radiophilus después de la irradiación con dosis variables de luz ultravioleta, se observó que solo el 0.1% de las células de M. luteus sobreviven si se irradian con dosis de 10,000 ergios/mm^2, exhibiendose una relación lineal entre la mortalidad y la dosis empleada hasta un valor de 10,000 ergios/mm^2. A esa misma dosis sobrevive hasta el 50% de las células de M. radiophilus, y a 5,000 ergios/mm^2 la sobrevivencia es del 100% pero si la dosis se incrementa hasta 18,000 ergios/mm^2 la mortalidad causada es del 99.9%.

Al analizar la cinética de formación de dímeros de pirimidina en las

células de M. radiophilus irradiadas con dosis crecientes de luz ultravioleta se detectó que con 8,000 ergios/mm^2 aparece solo un 1% de dímeros, a esta dosis la sobrevivencia era del 100%, esto sugiere que las células son capaces de sobrevivir haciendo funcionar sus mecanismos reparadores que eliminan el 1% de dímeros formados. La formación de dímeros fue lineal hasta una dosis de 10,000 ergios/mm^2 y con dosis de 30,000 ergios/mm^2 se detectó un 4% de dímeros formados.

La sobrevivencia de M. radiophilus a bajas dosis, es una evidencia de su capacidad para remover los dímeros formados, pero si el contenido de estos fotoproductos es muy elevado, por muy largo que sea el DNA se afectará severamente su sobrevivencia.

Estudios sobre la cinética de remoción de dímeros en M. radiophilus han demostrado que cuando se irradian células con dosis de 5,000 ergios/mm^2 la sobrevivencia es del 100% debido a que son capaces de remover hasta el 50% de los dímeros formados en un lapso de 30 minutos y en dos horas son removidos todos los fotoproductos. Con dosis de 10,000 ergios / mm^2 cuando la sobrevivencia es del 50% la velocidad de remoción de dímeros se reduce a la mitad en relación a la velocidad de remoción anterior. Cuando las células se irradian con dosis de 18,000 ergios/mm^2, la velocidad de remoción disminuye considerablemente por lo que solo el 0.1% de la población sobrevive.

II.-**RADIACION INFRARROJA (1,000-100,000 nm):** Se conoce muy poco sobre el efecto que esta radiación ocasiona a los microorganismos ya que la mayoría de esta radiación se convierte en calor o energía térmica al ponerse en contacto con los materiales sobre los que incide.

III.- **RADIACIONES IONIZANTES(< 10 nm):** Estas radiaciones muestran un efecto mutageno letal sobre los microorganismos, actúan directamente sobre el DNA causandole rupturas y delesiones severas , su acción indirecta consiste en la formación de radicales libres y epóxidos de la alta toxicidad.

El daño que ocasionan depende de factores ambientales, ya que en presencia de oxígeno molecular , los microorganismos son más susceptibles a su efecto , por lo contrario , la presencia de compuestos con grupos tiólicos ofrece cierta protección a los microorganismos.

A los rayos cósmicos y a los rayos X se les conoce como radiaciones ionizantes debido a que su energía es tan grande que cuando sus cuantos inciden sobre un material absorbente, son expulsados electrones de todos los tipos de atomos de las moléculas que constituyen el material , por lo tanto las moléculas se ionizan.

IV.- **LUZ VISIBLE:** Se ha demostrado que en la levadura de panadería la luz visible inhibe el crecimiento, la síntesis de proteínas, la adaptación respiratoria y la integridad de la membrana; varias observaciones sugieren que los citocromos participan en estos efectos inhibitorios, y se ha identificado a la luz azul como la que causa el efecto máximo.

Ninneman y colaboradores demostraron que la inhibición de la respiración por la luz visible era debido a ladestrucción del **citocromo b**, la fotodegradación de esta molécula depende de la presencia de oxígeno molecular; sin embargo, el cianuro y la azida, dos ligandos que compiten con el oxígeno por el sitio activo de la **citocromo oxidasa**, protegen en contra de la fotodestrucción.

Koch y su equipo demostraron que la luz cercana a la ultravioleta inactivaba el transporte membranal de azucares en Escherichia coli; Bernard y colaboradores han observado que cuando esta bacteria se somete a períodos cortos de exposición a la luz visible de ~405 nm se presentaba una inhibición del transporte de aminoácidos, que era dependiente de oxígeno.

Woodward, Cirilo y Edmunds en 1978 examinaron el efecto de la radiación visible sobre el crecimiento, transporte activo de aminoacidos e integridad de la membrana de la levadura Saccharomyces cerevisiae encontrando que el crecimiento de estas células era inhibido progresivamente a intensidades de luz superiores a 1,250 lux; a dosis menores hubo muy poco efecto sobre el tiempo de generación. A intensidades de radiación de 5,400 lux el crecimiento cesaba completamente después de dos dias y en seis dias las celulas morian.

Ya que el efecto de la luz visible sobre la velocidad de crecimiento y la viabilidad podían ser resultado de daños ocasionados sobre la membrana plasmática, se evaluó la fincionalidad de dos procesos asociados con membrana, como son la difusión facilitada de azúcares y el transporte activo de aminoacidos después de la irradiación con luz visible. Se observó que la velocidad de transporte de sorbosa en células crecidas en la luz (3,000 lux) se reducía en un 50% en comparación con las levaduras crecidas en la oscuridad. Además ocurría una inhibición en el transporte de aminoacidos como histidina, glutamato, alanina, tirosina, valina y leucina, detectandose porcentajes de inhibiciónde l transporte de aminoacidos del 89%, 84%, 81%, 77%, 71% y 70% respectivamente. Estos resultados sugieren que la integridad estructural de la membrana es susceptible a la radiación visible.

3.- T E M P E R A T U R A

De los factores físicos que afectan el crecimiento microbiano en cualquier medio ambiente, uno de los que más influencían en la selección de especies es la **temperatura.** Los microorganismos no poseen medios para controlar su temperatura interna, por lo que la temperatura del interior de la célula es determinada por la tempratura del entorno.

Algunos microorganismos son capaces de crecer sólo en un rango específico de temperatura bastante estrecho, menor de 10°, como ocurre con los patógenos para humanos, debido a lo cual han sido denominados **organismos estenotermófilos**, sin embargo, la mayoría de los microorganismos son **euritermófilos**, esto es, son capaces de crecer en un rango de temperatura más amplio aproximadamente de 10°C.

El efecto de la temperatura sobre una reacción o proceso bioquímico como el crecimiento está en función del Q_{10} o **Coeficiente de temperatura,** que es una relación de la velocidad de esa reacción o proceso bioquímico a cierta temperatura comparada con la velocidad desarrollada a una temperatura 10°C más baja según la siguiente ecuación:

$$Q_{10} = \frac{K_{t+10}}{K_t}$$

K_t= velocidad a una temperatura dada

K_{t+10}=velocidad a una temperatura 10°C más elevada

Para el crecimiento de Escherichia coli el Q_{10} es de 4.20 a temperaturas de 15°C a 25°C, y de 1.04 a temperaturas de 35°C - 45°C. Es decir, conforme la temperatura se incrementa disminuye el valor de Q_{10}.

LAS TEMPERATURAS CARDINALES

Recordemos que el agua libre solo ocurre en las temperaturas de la zona biocinética, y es ahí donde ocurre actividad biológica, pero ¿qué ocurre fuera de esos límites?

Tres valores de temperatura, a menudo llamadas **temperaturas cardinales** son usados comunmente para caracterizar el efecto de la tempratura sobre el crecimiento de una especie microbiana. Las **temperatura maxima** y **minima** de crecimiento definen los límites de temperatura dentro de los cuales es posible el crecimiento; a temperaturas inferiores o superiores a éstas **NO** ocurre la multiplicación. **La temperatura optima** es aquella en la que la proliferación es más rápida, es decir, donde la velocidad de crecimiento alcanza un valor máximo. Para la mayoría de los microorganismos ésta temperatura está más cerca de la tempratura máxima que a la mínima de crecimiento. Debe hacerse notar que la temperatura óptima de crecimiento está basada solamente en la velocidad de crecimiento y no necesariamente en el rendimiento celular neto. Se considera que las temperaturas cardinales son características del organismo, aunque pueden ser alteradas en algún grado por factores ambientales como el Aw, el pH, la concentración de sales o los nutientes disponibles.

Tipicamente, el crecimiento a la **temperatura mínima** es bastante lento, pero la velocidad se incrementa exponencialmente al aumentar la temperatura alcanzando un máximo a la **temperatura óptima** y cayendo dramáticamente hasta cero unos cuantos grados arriba de la temperatura óptima (Figura 2). Para la mayoría de los microorganismos la velocidad de crecimiento se incrementa dos a tres veces por cada aumento de 10 grados entre la temperatura mínima y óptima.

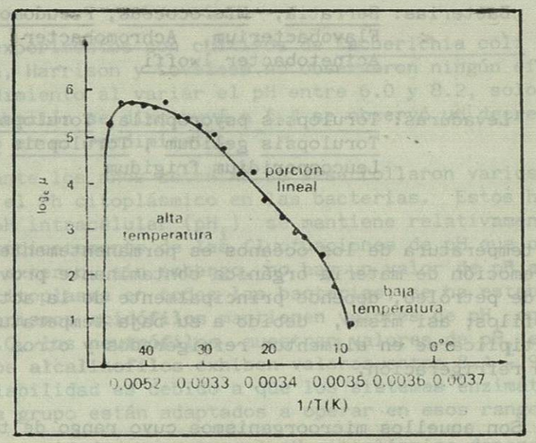


Fig. 2. Curva de Arrhenius donde se expresa la relación entre la velocidad de crecimiento microbiana y al temperatura.

El crecimiento y la viabilidad no son afectados de la misma manera por la temperatura; temperaturas de incubación superiores a la máxima de crecimiento son **letales** para el microorganismo, pues afectan tanto al crecimiento como a la viabilidad; en cambio, temperaturas inferiores a la temperatura mínima de crecimiento no son letales, afectan al crecimiento pero no a la viabilidad. Por lo tanto, a bajas temperaturas los microorganismos pueden permanecer viables por periodos largos de tiempo sin mostrar una proliferación apreciable, solamente exhibiendo una mínima pérdida en la viabilidad.

Mientras que cualquier especie microbiana es incapaz de crecer en rangos de temperaturas superiores a los 40°C, ciertos microorganismos pueden crecer abajo de 0°C y otros a temperaturas superiores a los 80°C. Basados en sus temperaturas optimas de crecimiento, los microorganismos se clasifican como:

a) **CRIOFILOS o PSICROFILOS**
b) **MESOFILOS**
c) **TERMOFILOS**