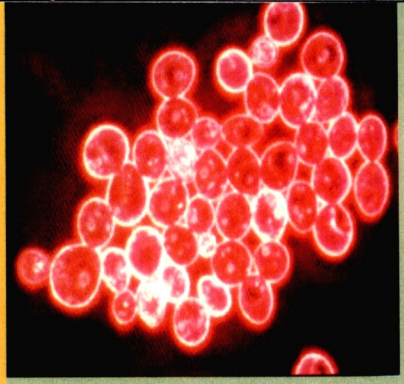
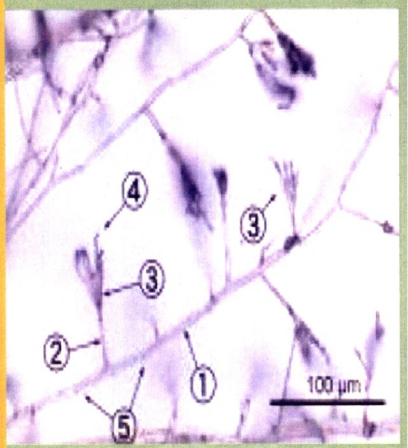
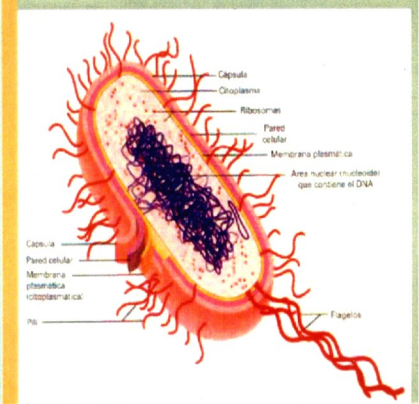
Universidad Nacional Agraria



TEXTO DE MICROBIOLOGIA I





MSc. Lázaro Morejón
Dr. Enrique Pardo Coba (q.e.p.d.)

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL

"Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible"

TEXTO DE MICROBIOLOGIA I

Autor Lázaro Morejón
Autor Dr. Enrique Pardo Coba (q.e.p.d.)

Managua, Nicaragua
Junio, 2008

INTRODUCCION

El presente texto de Microbiología I tiene como fin servir de introducción a la Bacteriología destacando las características morfológicas y fisiológicas de las bacterias, primordialmente está dedicado a las especies de bacterias y hongos patógenos.

El estudio completo de un microorganismo patógeno abarca otras características a parte de las morfológicas y fisiológicas como son, la sinonimia e historia; distribución y transmisión; morfología y tinción; necesidades y características de cultivo; resistencias; propiedades bioquímicas y toxinas; poder patógeno y diagnóstico de laboratorio.

Es imprescindible que el estudiante de Medicina Veterinaria se familiarice con las bacterias y hongos, tanto los que son comunes al hombre y a los animales como a los que afectan solamente a las diferentes especies animales para de esta manera establecer el agente etiológico de las diversas enfermedades de origen bacteriano y micótico dada la estrecha relación que existe entre el hombre y los animales y el consumo de productos de origen animal.

Aunque este texto se dirige fundamentalmente a los estudiantes de Medicina Veterinaria consideramos que la información que contienen será valiosa para los investigadores y técnicos de los servicios de sanidad animal.

CONTENIDO

	Páginas:
CAPITULO 1: INTRODUCCION A LA MICROBIOLOGIA	**2**
CAPITULO 2: ENCLAVE TAXONÓMICO DE LOS MICROORGANISMOS	**17**
CAPITULO 3: ESTUDIO DE LAS BACTERIAS	**20**
CAPITULO 4: MOVILIDAD BACTERIANA. LA ENDOSPORA BACTERIANA Y LA ESPORULACIÓN	**34**
CAPITULO 5: NUTRICION BACTERIANA	**45**
CAPITULO 6: RESPIRACION AEROBIA Y ANAEROBIA	**62**
CAPITULO 7: ECOLOGIA MICROBIANA	**68**
CAPITULO 8: ACCIÓN DE LOS AGENTES QUÍMICOS SOBRE LOS MICROORGANISMOS	**81**
CAPITULO 9: REPRODUCCION BACTERIANA	**92**
CAPITULO 10: ESTUDIO DE LOS HONGOS	**100**

CAPITULO 1

INTRODUCCION A LA MICROBIOLOGIA

QUE ES LA MICROBIOLOGIA

La Microbiología es la ciencia que se ocupa del estudio de los microorganismos, es decir, de aquellos organismos demasiado pequeños para poder ser observados a simple vista, y cuya visualización requiere el empleo del microscopio.

Esto hace que el objeto de esta disciplina venga determinado por la metodología apropiada para poner en evidencia, y poder estudiar, a los microorganismos. Precisamente, el origen tardío de la Microbiología con relación a otras ciencias biológicas, y el reconocimiento de las múltiples actividades desplegadas por los microorganismos, hay que atribuirlos a la carencia, durante mucho tiempo, de los instrumentos y técnicas pertinentes. Con la invención del microscopio en el siglo XVII comienza el lento despegue de una nueva rama del conocimiento, inexistente hasta entonces. Durante los siguientes 150 años su progreso se limitó casi a una mera descripción de tipos morfológicos microbianos, y a los primeros intentos taxonómicos, que buscaron su encuadramiento en el marco de los "sistemas naturales" de los Reinos Animal y Vegetal.

El asentamiento de la Microbiología como ciencia está estrechamente ligado a una serie de controversias seculares (con sus numerosas filtraciones de la filosofía e incluso de la religión de la época), que se prolongaron hasta finales del siglo XIX. La resolución de estas polémicas dependió del desarrollo de una serie de estrategias experimentales fiables (esterilización, cultivos puros, perfeccionamiento de las técnicas microscópicas, etc.), que a su vez dieron nacimiento a un cuerpo coherente de conocimientos que constituyó el núcleo aglutinador de la ciencia microbiológica. El reconocimiento del origen microbiano de las fermentaciones, el definitivo abandono de la idea de la generación espontánea, y el triunfo de la teoría germinal de la enfermedad, representan las conquistas definitivas que dan carta de naturaleza a la joven Microbiología en el cambio de siglo.

Tras la Edad de Oro de la Bacteriología, inaugurada por las grandes figuras de Pasteur y Koch, la Microbiología quedó durante cierto tiempo como una disciplina descriptiva y aplicada, estrechamente imbricada con la Medicina, y con un desarrollo paralelo al de la Química, que le aportaría varios avances metodológicos fundamentales. Sin embargo, una corriente, en principio minoritaria, dedicada a los estudios básicos centrados con ciertas bacterias del suelo poseedoras de capacidades metabólicas especiales, incluyendo el descubrimiento de las que afectan a la nutrición de las plantas, logró hacer ver la ubicuidad ecológica y la extrema diversidad fisiológica de los microorganismos. De esta forma, se establecía una cabeza de puente entre la Microbiología y otras ciencias biológicas, que llegó a su momento decisivo cuando se comprobó la unidad química de todo el mundo vivo, y se demostró, con material y técnicas microbiológicas que la molécula de la herencia era el ADN. Con ello se asiste a un íntimo y fértil intercambio entre la Microbiología, la Genética y la Bioquímica, que se plasma en el nacimiento de la Biología Molecular, base del espectacular auge de la Biología desde mediados del siglo XX.

Por otro lado, el "programa" inicial de la Microbiología (búsqueda de agentes infectivos, desentrañamiento y aprovechamiento de los mecanismos de defensa del hospedador) condujeron a la creación de ciencias subsidiarias (Virología, Inmunología) que finalmente adquirieron su mayoría de edad y una acentuada autonomía.

Por último, la vertiente aplicada que estuvo en la base de la creación de la Microbiología, mantuvo su vigencia, enriquecida por continuos aportes de la investigación básica, y hoy muestra una impresionante "hoja de servicios" y una no menos prometedora perspectiva de expansión a múltiples campos de la actividad humana, desde el control de enfermedades infecciosas (higiene, vacunación, quimioterapia, antibioterapia) hasta el aprovechamiento económico racional de los múltiples procesos en los que se hallan implicados los microorganismos (biotecnologías).

OBJETIVO DE LA MICROBIOLOGÍA

El objeto de estudio de una ciencia se puede desglosar en dos apartados: objeto material y objeto formal

OBJETO MATERIAL: LOS MICROORGANISMOS

La Microbiología es la ciencia que se ocupa del estudio de los microorganismos, es decir, de aquellos organismos demasiado pequeños para poder ser observados a simple vista, y cuya visualización requiere el empleo del microscopio. Esta definición implica que el objeto material de la Microbiología viene delimitado por el tamaño de los seres que investiga, lo que supone que abarca una enorme heterogeneidad de tipos estructurales, funcionales y taxonómicos: desde partículas no celulares como los virus, viroides y priones, hasta organismos celulares tan diferentes como las bacterias, los protozoos y parte de las algas y de los hongos. De esta manera la Microbiología se distingue de otras disciplinas organísmicas (como la Zoología y la Botánica) que se centran en grupos de seres vivos definidos por conceptos biológicos homogéneos, ya que su objeto de indagación se asienta sobre un criterio artificial que obliga a incluir entidades sin más relación en común que su pequeño tamaño, y a excluir a diversos organismos macroscópicos muy emparentados con otros microscópicos.

Podemos definir, pues, a los microorganismos como seres de tamaño microscópico dotados de individualidad, con una organización biológica sencilla, bien sea acelular o celular, y en este último caso pudiendo presentarse como unicelulares, cenocíticos, coloniales o pluricelulares, pero sin diferenciación en tejidos u órganos, y que necesitan para su estudio una metodología propia y adecuada a sus pequeñas dimensiones. Bajo esta denominación se engloban tanto microorganismos celulares como las entidades subcelulares

OBJETO FORMAL

Todos los aspectos y enfoques desde los que se pueden estudiar los microorganismos conforman lo que denominamos objeto formal de la Microbiología: características estructurales, fisiológicas, bioquímicas, genéticas, taxonómicas, ecológicas, etc., que conforman el núcleo general o cuerpo básico de conocimientos de esta ciencia. Por otro lado, la Microbiología también se ocupa de las distintas actividades microbianas en relación con los intereses humanos, tanto las que pueden acarrear consecuencias perjudiciales (y en este caso estudia los nichos ecológicos de los

correspondientes agentes, sus modos de transmisión, los diversos aspectos de la microbiota patógena en sus interacciones con el hospedador, los mecanismos de defensa de éste, así como los métodos desarrollados para combatirlos y controlarlos), como de las que reportan beneficios (ocupándose del estudio de los procesos microbianos que suponen la obtención de materias primas o elaboradas, y de su modificación y mejora racional con vistas a su imbricación en los flujos productivos de las sociedades).

Finalmente, la Microbiología ha de ocuparse de todas las técnicas y metodologías destinadas al estudio experimental, manejo y control de los microorganismos, es decir, de todos los aspectos relacionados con el modo de trabajo de una ciencia empírica.

DESARROLLO HISTÓRICO DE LA MICROBIOLOGÍA

La Microbiología, considerada como una ciencia especializada, no aparece hasta finales del siglo XIX, como consecuencia de la confluencia de una serie de progresos metodológicos que se habían empezado a incubar lentamente en los siglos anteriores, y que obligaron a una revisión de ideas y prejuicios seculares sobre la dinámica del mundo vivo.

Siguiendo el ya clásico esquema de Collard (l976), podemos distinguir cuatro etapas o periodos en el desarrollo de la Microbiología:

- Primer periodo, eminentemente especulativo, que se extiende desde la antigüedad hasta llegar a los primeros microscopistas.
- Segundo periodo, de lenta acumulación de observaciones (desde l675 aproximadamente hasta la mitad del siglo XIX), que arranca con el descubrimiento de los microorganismos por Leeuwenhoek (l675).
- Tercer periodo, de cultivo de microorganismos, que llega hasta finales del siglo XIX, donde las figuras de Pasteur y Koch encabezan el logro de cristalizar a la Microbiología como ciencia experimental bien asentada.
- Cuarto periodo (desde principios del siglo XX hasta nuestros días), en el que los microorganismos se estudian en toda su complejidad fisiológica, bioquímica, genética, ecológica, etc., y que supone un extraordinario crecimiento de la Microbiología, el surgimiento de disciplinas microbiológicas especializadas (Virología, Inmunología, etc), y la estrecha imbricación de las ciencias microbiológicas en el marco general de las Ciencias Biológicas. A continuación se realiza un breve recorrido histórico de la disciplina microbiológica, desglosando los períodos 3º y 4º en varios apartados temáticos.

PERIODO PREVIO AL DESCUBRIMIENTO DEL MICROSCOPIO

Si bien el descubrimiento efectivo de seres vivos no visibles a simple vista debió aguardar hasta el último tercio del siglo XVII, sus actividades son conocidas por la humanidad desde muy antiguo, tanto las beneficiosas, representadas por las fermentaciones implicadas en la producción de bebidas alcohólicas, pan y derivados lácteos, como las perjudiciales, en forma de enfermedades infecciosas.

Diversas fuentes escritas de la antigüedad griega y romana hablan de gérmenes invisibles que transmiten enfermedades contagiosas. Lucrecio (96-55 a.C.), en su "*De rerum natura*" hace

varias alusiones a "semillas de enfermedad". En el Renacimiento europeo, Girolamo Frascatorius, en su libro "*De contagione et contagionis"* (1546) dice que las enfermedades contagiosas se deben a "gérmenes vivos" que pasan de diversas maneras de un individuo a otro. Estos inicios de explicación que renunciaban a invocar causas sobrenaturales fueron probablemente catalizados por la introducción en Europa de la sífilis, una enfermedad en la que estaba clara la necesidad de contacto para su contagio. Pero la "cosa" que se transmite en la enfermedad siguió siendo objeto de conjeturas durante mucho tiempo.

EL PERIODO DE LOS PRIMEROS MICROSCOPISTAS

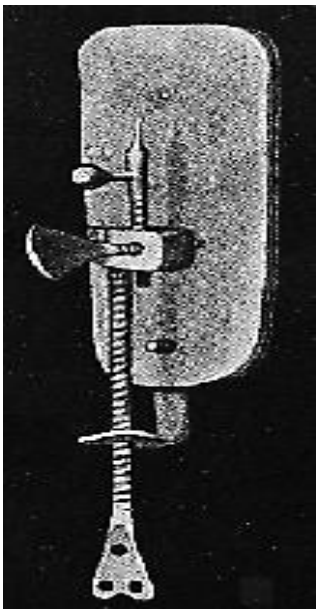
Ya en el siglo XIV, con la invención de las primeras lentes para corregir la visión, surgió una cierta curiosidad sobre su capacidad de aumentar el tamaño aparente de los objetos. En el siglo XVI surgieron algunas ideas sobre aspectos de la física óptica de las lentes de aumento, pero no encontraron una aplicación inmediata. Se dice que Galileo hizo algunas observaciones "microscópicas" invirtiendo su telescopio a partir de lentes montadas en un tubo, pero en cualquier caso está claro que no tuvieron ninguna repercusión.

La primera referencia segura sobre el microscopio (1621) se debe a Constantijn Huygens, quien relata que el inglés Cornelis Drebbel tenía en su taller un instrumento magnificador, que recibió el nombre de *microscopium* en l625, en la Accademia dei Lincei, de Roma.

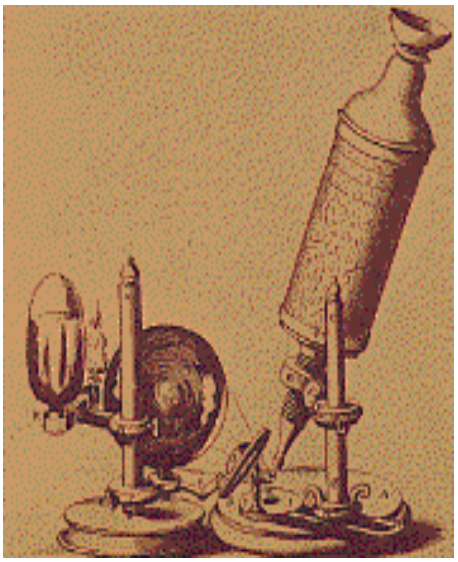
El descubrimiento de los microorganismos fue obra de un comerciante holandés de tejidos, Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723), quien en su pasión por pulir y montar lentes casi esféricas sobre placas de oro, plata o cobre, casi llegó a descuidar sus negocios. Fabricó unos cuatrocientos microscopios simples, con los que llegó a obtener aumentos de casi 300 diámetros. En 1675 descubrió que en una gota de agua de estanque pululaba una asombrosa variedad de pequeñas criaturas a las que denominó "animálculos". En 1683 descubre las bacterias, por lo que se considera el "padre de la Microbiología". Durante varias décadas Leeuwenhoek fue comunicando sus descubrimientos a la Royal Society de Londres a través de una serie de cartas que se difundieron, en traducción inglesa, en las "Philosophical Transactions". Sus magníficas dotes de observador le llevaron asimismo a describir protozoos (como *Giardia*, que encontró en sus propias heces), la estructura estriada del músculo, la circulación capilar, a descubrir los espermatozoides y los glóbulos rojos (por lo que también se le considera el fundador de la Histología animal), así como a detallar diversos aspectos estructurales de las semillas y embriones de plantas. Leeuwenhoek se percató de la abundancia y ubicuidad de sus animálculos, observándolos en vinagre, placa dental, etc.

Aunque los descubrimientos de Leeuwenhoek despertaron interés al ser comunicados, pocos intentaron o pudieron reproducirlos seriamente. Además, la fabricación de lentes sencillas de gran aumento era difícil y el manejo de los microscopios simples, bastante engorroso.

Simultáneamente el inglés Robert Hooke (1635-1703) usando microscopios compuestos, describió los hongos filamentosos (1667), y descubrió la estructura celular de las plantas (*Micrographia*, 1665), acuñando el término célula. Pero el trabajo con microscopios compuestos aplicados al estudio de los "animálculos" languideció durante casi 200 años, debido a sus imperfecciones ópticas, hasta que hacia 1830 se desarrollaron las lentes acromáticas.



Microscopio simple de Leeuwenhoek



Microscopio compuesto de Hooke

EL DEBATE SOBRE LA GENERACIÓN ESPONTÁNEA.

La autoridad intelectual de Aristóteles por un lado, y la autoridad moral representada por la Biblia, por otro, junto con las opiniones de escritores clásicos como Galeno, Plinio y Lucrecio, a los que se citaba como referencias incontrovertibles en la literatura médica en la Edad Media y Renacimiento, dieron carta de naturaleza a la idea de que algunos seres vivos podían originarse a partir de materia inanimada, o bien a partir del aire o de materiales en putrefacción. Esta doctrina de la "*generatio spontanea"* o abiogénesis, fue puesta en entredicho por los experimentos de Francesco Redi (1621-1697), quien había acuñado la expresión "*Omne vivum ex ovo"* (1668), tras comprobar que los insectos y nematodos procedían de huevos puestos por animales adultos de su misma especie. Demostró que si un trozo de carne era cubierto con gasa de forma que las moscas no podían depositar allí sus huevos, no aparecían "gusanos", que él correctamente identificó como fases larvarias del insecto. Los descubrimientos de Redi tuvieron el efecto de desacreditar la teoría de la generación espontánea para los animales y plantas, pero la reavivaron respecto de los recién descubiertos "animálculos", de modo que aunque se aceptó la continuidad de la vida en cuanto a sus formas superiores, no todos estaban dispuestos a admitir el más amplio "*Omne vivum ex vivo"* aplicado a los microorganismos.

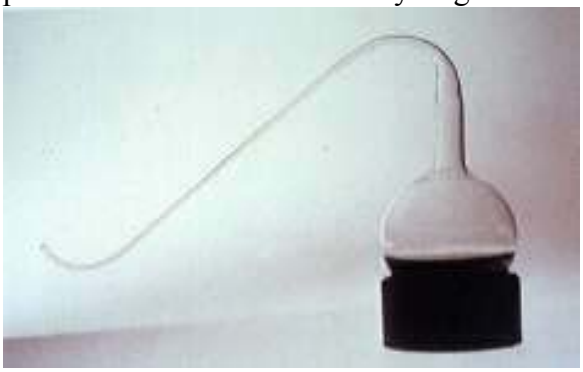
Hubo que esperar un siglo más hasta que una serie de naturalistas recomenzaran el ataque a la teoría preformacionista. Lazzaro Spallanzani (1729-1799) sostuvo una disputa con J.T. Needham (1713-1781) en la que el primero demostró que los "infusorios" no aparecían en muestras de maceraciones animales o vegetales sometidas durante tiempo suficiente a ebullición en frascos

herméticamente cerrados, pero volvían a aparecer si se practicaban agujeros en el recipiente. Sin embargo los preformacionistas no se daban por vencidos; el mismo Needham, recogiendo una idea ya expresada por Huygens, amigo de Leeuwenhoek, replicó -con argumentos vitalistas muy propios de la época- que el calor había destruido la "fuerza vegetativa" de las infusiones y había cambiado la "cualidad" del aire dentro de los frascos.

Durante el primer tercio del siglo XIX la doctrina de la arquegénesis o generación espontánea recibió un último refuerzo antes de morir, debido por un lado a razones extracientíficas (el auge del concepto de transmutación producido por la escuela de la filosofía de la naturaleza), y por otro al descubrimiento del oxígeno y de su importancia para la vida, de modo que los experimentos de Spallanzani se interpretaron como que al calentarse las infusiones, el oxígeno del aire se destruía, y por lo tanto desaparecía la "fuerza vegetativa" que originaba la aparición de microorganismos. Theodor Schwann (1810-1882) presentó en 1836 un método seguro para refutar la teoría abiogénica: calentó maceraciones en frascos a los que se había eliminado previamente el aire, pero no continuó trabajando en esta línea.

Para complicar más las cosas, la publicación de "*Sobre el origen de las especies"* por Darwin en 1859, fue utilizada por algunos preformacionistas para apoyar sus argumentos. El mismo Haeckel, en una fecha tan tardía como 1866, se mostraba escéptico ante las pruebas aportadas por Pasteur.

Pasteur Fue, efectivamente Louis Pasteur (1822-1895) el que asestó el golpe definitivo y zanjó la cuestión a favor de la teoría biogénica. En un informe a la Académie de Sciences de París, en 1860 ("*Expériences rélatives aux générations dites spontanées"*) y en escritos posteriores comunica sus sencillos y elegantes experimentos: calentó infusiones en matraces de vidrio a los que estiraba lateralmente el cuello, haciéndolo largo, estrecho y sinuoso, y dejándolo sin cerrar, de modo que el contenido estuviera en contacto con el aire; tras esta operación demostró que el líquido no desarrollaba microorganismos, con lo que eliminó la posibilidad de que un "aire alterado" fuera la causa de la no aparición de gérmenes. Antes bien, comprobó que los gérmenes del aire quedaban retenidos a su paso por el largo cuello sinuoso, en las paredes del tubo, y no alcanzaban el interior del recipiente donde se encontraba la infusión, quedando ésta estéril indefinidamente. Sólo si se rompía el cuello lateral o si se inclinaba el frasco de modo que pasara parte de líquido a la porción de cuello, los gérmenes podían contaminar la infusión y originar un rápido crecimiento.



Frasco con "cuello de cisne" de Pasteur, con el que refutó las ideas sobre la generación espontánea

En 1861 Pasteur publica otro

informe en el que explica cómo se pueden capturar los "cuerpos organizados" del aire con ayuda de un tubo provisto de un tapón de algodón como filtro, y la manera de recuperarlos para su observación microscópica. De esta forma quedaba definitivamente aclarado el origen de los microorganismos, y se abría la Edad de Oro del estudio científico de las formas de vida no observables a simple vista.

Los últimos escépticos quedaron silenciados cuando en 1877 John Tyndall (1820-1893) aplicó su sistema de esterilización por calentamiento discontinuo (hoy conocida precisamente como tindalización), que evidenció la existencia de formas microbianas de reposo muy resistentes al calor, lo cual fue confirmado poco más tarde por Ferdinand Cohn al descubrir las esporas bacterianas.

EL DEBATE SOBRE LOS FERMENTOS

Un segundo factor contribuyente al nacimiento de la ciencia microbiológica fue el establecimiento de la relación que une ciertas transformaciones químicas que se dan en las infusiones con el crecimiento de los gérmenes en ellas existentes. Cagniard-Latour en 1836, y Schwann y Kützing en 1837 habían sugerido que las levaduras eran las causantes de la fermentación alcohólica por la que el azúcar pasa a alcohol etílico y dióxido de carbono, pero se encontraron con la crítica adversa de los grandes químicos de la época (Berzelius, Wohler y Liebig). Liebig, hacia 1840, había realizado importantes confirmaciones a la "teoría mineral" sobre la nutrición de las plantas, enfrentándose a la "teoría del humus" sostenida por Thaer, asestando un golpe a las ideas vitalistas heredadas de Leibniz. Puesto que se consideraba a las levaduras como plantas microscópicas, se suponía que los procesos de fermentación y putrefacción se debían a fenómenos químicos de descomposición y muerte encuadrables en el marco de la teoría mineral de la fisiología vegetal. Su convencimiento de que toda actividad vital se podía explicar en términos de química y física retrasó por algún tiempo la adscripción de estos fenómenos a células vivas.

Fue Pasteur (que, desde sus primeros estudios sobre las propiedades ópticas de los cristales de tartrato, venía suponiendo que estos compuestos tenían un orígen orgánico) quien de nuevo intervino en el debate de forma decisiva. En 1857 demostró que los agentes de la fermentación láctica eran microorganismos, trabajando sobre un problema que había surgido entre los destiladores de Lille cuando en sus cubas la fermentación alcohólica se vio sustituida por una indeseable fermentación láctica. Este fue el inicio de una larga serie de estudios que habría de durar hasta 1876, en los que Pasteur identificó distintos microorganismos responsables de diferentes clases de procesos fermentativos. Así, en 1860 adscribe inequívocamente la fermentación alcohólica a ciertos tipos de levaduras, y en 1866, en sus *Études sur le vin* resume sus hallazgos al respecto, inaugurando la Microbiología Aplicada, una de las primeras derivaciones prácticas no empíricas emanadas de la Biología. A finales del siglo XIX eminentes biólogos como Hansen, en Copenhague, y Beijerink, en Delft, desarrollaban su actividad en industrias y destilerías.

Trabajando sobre los agentes de la fermentación butírica, Pasteur descubrió la presencia de microorganismos que se desarrollaban en ausencia de oxígeno, lo cual desmentía la creencia de que todas las formas de vida necesitan aire para crecer. Acuñó los términos aerobiosis y anaerobiosis para denominar, respectivamente, a la vida en presencia y en ausencia de oxígeno.

Tras el descubrimiento de la anaerobiosis, el mismo Pasteur comprendió las distintas implicaciones energéticas subyacentes a la utilización de sustratos orgánicos en presencia y en ausencia de oxígeno, demostrando que, en el segundo caso el rendimiento (medido como crecimiento microbiano) era siempre menor, al no poder realizarse la degradación total de las correspondientes sustancias.

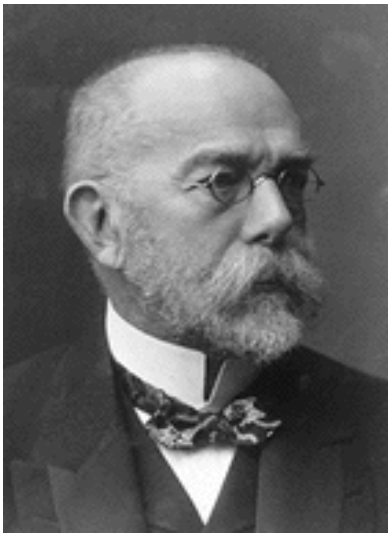
Una profundización en los fenómenos de fermentación llegó cuando en 1897 Buchner obtuvo, a partir de levaduras, una preparación enzimática (zimasa) que era capaz de realizar la misma transformación de "fermentación" que las células vivas. Este descubrimiento, que evocaba las propuestas de Berzelius y Liebig, supuso en realidad la confluencia de los enfoques químico y biológico: las fermentaciones eran procesos químicos catalizados por enzimas presentes dentro de células vivas, que podían ser estudiados extracelularmente. De esta forma, la Bioquímica, nacida como una rama de la química fisiológica, que se venía especializando en la enzimología, encontró una alianza fructífera y duradera con la joven Microbiología.

LOS AVANCES TÉCNICOS

La doctrina del pleomorfismo, vigente durante buena parte del siglo XIX, mantenía que los microorganismos adoptaban formas y funciones cambiantes dependiendo de las condiciones ambientales. A estas ideas se oponían frontalmente investigadores como Koch, Pasteur y Cohn, que estaban convencidos de la especificidad y constancia morfológica y fisiológica de cada tipo de microorganismo (monomorfismo). El pleomorfismo había surgido como una explicación a la gran variedad de formas y actividades que aparecían en un simple frasco de infusión, pero ya Pasteur, en sus estudios sobre la fermentación, se había percatado de que los cultivos que aparecían podían considerarse como una sucesión de distintas poblaciones de microorganismos predominantes, que, a resultas de sus actividades, condicionaban la ulterior composición de la comunidad microbiana. La solución definitiva a esta cuestión dependía, de nuevo, de un desarrollo técnico, que a su vez iba a suministrar una de las herramientas características de la nueva ciencia: los métodos de cultivo puro.

Los primeros cultivos puros fueron obtenidos por el micólogo Brefeld, quien logró aislar esporas de hongos y cultivarlas sobre medios sólidos a base de gelatina. Por su menor tamaño, este método se hacía inviable para las bacterias, por lo que se recurrió a un método basado en diluciones: Lister, en 1878 realizó diluciones secuenciales de cultivos mixtos, hasta lograr muestras en las que existía una sola célula. Pero la técnica era larga y tediosa y, además, normalmente sólo se lograban aislar células del tipo bacteriano más abundante en el cultivo original; sin embargo, el experimento sirvió para confirmar la naturaleza "particulada" de los agentes de las fermentaciones.

Robert Koch



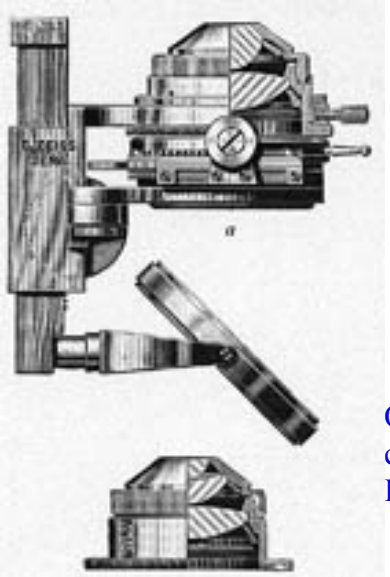
Por aquella época Koch buscaba con ahínco métodos más sencillos de cultivo puro, indispensables para proseguir sus investigaciones sobre bacterias patógenas. Primero (y quizá de forma un tanto casual) empleó rodajas de patata como sustrato sólido nutritivo sobre el que se podían desarrollar colonias macroscópicas de bacterias que presentaban morfología característica, que Koch interpretó como resultantes del crecimiento a partir de células individuales. Pero enseguida recurrió a compactar el típico caldo de cultivo a base de carne (diseñado por Loeffler) añadiéndole gelatina (1881). El medio sólido así logrado era transparente, lo que permitía visualizar fácilmente los rasgos coloniales, y contenía los nutrientes adecuados para el crecimiento de una amplia gama de bacterias. Éstas eran inoculadas en la superficie del medio con un hilo de platino pasado previamente por la llama, por la técnica de siembra en estría. Sin embargo, la gelatina presentaba los inconvenientes de ser atacada por determinados microorganismos, y de tener un bajo punto de fusión; ambos problemas se solventaron cuando en 1882 el médico alemán Walter Hesse, siguiendo una sugerencia de su mujer Fanny, introdujo el agar-agar (polisacárido extraído de algas rojas) como nuevo agente solidificante. El trabajo de Koch ya citado tuvo la trascendental consecuencia de derribar las ideas pleomorfistas, y supuso la primera propuesta del concepto de especie dentro del mundo bacteriano. En 1887 Petri, un ayudante de Koch, sustituyó las engorrosas bandejas de vidrio cubiertas con campanas, usadas hasta entonces para los cultivos sólidos, por un sistema manejable de placas de cristal planas, que se conoce como cajas de Petri.

El desarrollo de los medios selectivos y de enriquecimiento fue una consecuencia de las investigaciones llevadas a cabo por Beijerinck y Winogradsky entre 1888 y los primeros años del siglo XX, sobre bacterias implicadas en procesos biogeoquímicos y poseedoras de características fisiológicas distintivas (quimioautótrofas, fijadoras de nitrógeno, etc.). Estos medios, donde se aplica a pequeña escala el principio de selección natural, se diseñan de forma que su composición química definida favorezca sólo el crecimiento de ciertos tipos fisiológicos de microorganismos, únicos capaces de usar ciertos nutrientes del medio.

Otra importante aportación a este "período de cultivo" dentro del desarrollo de la Microbiología surgió del uso de medios diferenciales, en los que se manifiesta algún rasgo bioquímico o metabólico, lo que contribuye a la identificación microbiana. Fue Würtz quien, en 1892, introdujo el uso de indicadores de pH, incorporados en los medios, lo cual permitía revelar la producción de acidificaciones por fermentación en ciertas bacterias.

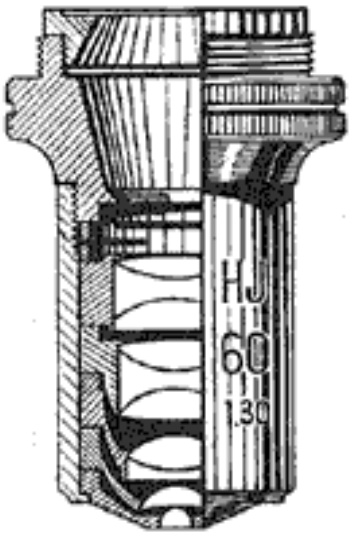
Mientras tanto, en la ciudad de Jena se había creado una atmósfera de progreso donde confluían grandes naturalistas como Haeckel, Strassburger o Abbé interaccionando con una pujante editorial especializada en Biología y Medicina (Gustav Fischer) y con una poderosa industria óptica y química. Estas influencias recíprocas se plasmaron en numerosos proyectos que reflejaban la efervescencia de las ciencias naturales tras la estela de Darwin (cfr. Jahn *et al.*, 1985).

Concretamente, la industria óptica de Abbé y Zeiss, que se mantenía en conexión con la compañía vidriera Schott, pudo satisfacer la necesidad de Koch de perfeccionar el microscopio compuesto, introduciendo lentes acromáticas y una iluminación inferior provista de condensador. El mismo Abbé desarrolló en 1878 el objetivo de inmersión en aceite. Por otro lado, la industria química BASF, que por aquella época se encontraba en pleno auge de patentes de nuevos colorantes, sumistró al laboratorio de Koch una serie de derivados de anilina que teñían las bacterias permitiendo su fácil visualización al microscopio en frotis de tejidos infectados. En 1875 Carl Weigert tiñó bacterias con pirocarmín, un colorante que ya venía siendo usado desde hacía unos años en estudios zoológicos. En años sucesivos se fueron introduciendo el azul de metileno (Koch, 1877), la fuchsina, y el violeta cristal. En 1882-1883 Ziehl y Neelsen desarrollan su método de ácido-alcohol resistencia para teñir *Mycobacterium tuberculosis*. En 1884 el patólogo danés Christian Gram establece una tinción de contraste que permite distinguir dos tipos bacterianos en función de sus reacción diferencial de tinción y que, como se vería mucho más tarde, reflejaba la existencia de dos grupos de bacterias con rasgos estructurales distintivos. En 1890 Loeffler logra visualizar flagelos bacterianos por medio de su técnica de impregnación argéntica. Como veremos más adelante, la misma industria de colorantes alemana previa a la primera guerra mundial fue decisiva también para los comienzos de la quimioterapia.



Iluminación del microscopio, fruto de la colaboración entre Koch y Abbe

Objetivo de inmersión, fruto de la colaboración entre Koch y la Industria óptica Carl Zeiss



Estas innovaciones técnicas (métodos de cultivo, microscopía y tinciones) fueron fundamentales (junto con los sistemas de esterilización abordados en el anterior apartado) para la consolidación de la Microbiología como ciencia, permitiendo eliminar las grandes dosis de especulación que hasta entonces habían predominado.

EL PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS EN LAS ENFERMEDADES

Durante el siglo XIX la atención de muchos naturalistas se había dirigido hacia las diversas formas de animales y plantas que vivían como parásitos de otros organismos. Este interés se redobló tras la publicación de los libros de Darwin, estudiándose las numerosas adaptaciones evolutivas que los distintos parásitos habían adquirido en su peculiar estilo de vida. Sin embargo,

la adjudicación de propiedades de parásitos a los microorganismos vino del campo médico y veterinario, al revalorizarse las ideas sobre el origen germinal de las enfermedades infecciosas.
En 1835 Agostino Bassi (1773-1856) demostró que cierta enfermedad del gusano de seda (*mal di segno*), que había hecho su aparición en Lombardía, se debía a un hongo (*Botrytis bassiana*). Cuatro años más tarde J.L. Schönlein descubrió la asociación de un hongo con una enfermedad humana de la piel. En 1840 Henle, de la escuela fisiológica de Johannes Müller, planteó la teoría de que las enfermedades infecciosas están causadas por seres vivos invisibles, pero de nuevo la confirmación de estas ideas tuvo que esperar a que la intervención de Pasteur demostrara la existencia de microorganismos específicos responsables de enfermedades.

Hacia mediados del siglo XIX otra enfermedad infecciosa (pebrina) comenzó a diseminarse por los criaderos de gusano de seda de toda Europa, alcanzando finalmente a China y Japón. A instancias de su maestro Jean Baptiste Dumas, Pasteur aceptó el reto de viajar a la Provenza para investigar esta enfermedad que estaba dejando en la ruina a los industriales sederos, a pesar de que nunca hasta entonces se había enfrentado con un problema de patología. Es más que probable que Pasteur viera aquí la oportunidad de confirmar si sus estudios previos sobre las fermentaciones podían tener una extensión hacia los procesos fisiológicos del hombre y de los animales. Es sorprendente que, al principio no se mostrara dispuesto a aceptar la idea de que la pebrina fuera una enfermedad ocasionada por un agente extraño, creyendo durante los dos primeros años que se trataba de alteraciones meramente fisiológicas. Tras una serie de tanteos, y en medio de una intensa actividad intelectual que le obligaba a repasar continuamente los experimentos y las conclusiones extraídas, inmerso en el drama personal de la muerte de su padre y de dos de sus hijas en un corto lapso de tiempo, Pasteur llega finalmente, en 1869, a identificar al protozoo *Nosema bombycis* como el responsable de la epidemia, y por medio de una serie de medidas de control, ésta comienza a remitir de modo espectacular.

La intervención de bacterias como agentes específicos en la producción de enfermedades fue descubierta a raíz de una serie de investigaciones sobre el carbunco o ántrax, enfermedad que afecta a ganado y que puede transmitirse al hombre. C. Davaine, entre 1863 y 1868, encontró que en la sangre de vacas afectadas aparecían grandes cantidades de microorganismos a los que llamó *bacteridios*; además, logró inducir la enfermedad experimentalmente en vacas sanas, inoculándoles muestras de sangre infectada. En 1872 el médico alemán C.J. Eberth consiguió aislar los bacilos filtrando sangre de animales carbuncosos. Pero fue Robert Koch (1843-1910), que había sido alumno de Henle, quien con su reciente técnica de cultivo puro logró, en 1876, el primer aislamiento y propagación *in vitro* del bacilo del ántrax (*Bacillus anthracis*), consiguiendo las primeras microfotografías sobre preparaciones secas, fijadas y teñidas con azul de metileno. Más tarde (1881), Koch y sus colaboradores confirmaron que las esporas son formas diferenciadas a partir de los bacilos, y más resistentes que éstos a una variedad de agentes. Pero más fundamental fue su demostración de que la enfermedad se podía transmitir sucesivamente a ratones sanos inoculándoles bacilos en cultivo puro, obtenidos tras varias transferencias en medios líquidos.

Este tipo de estrategias para demostrar el origen bacteriano de una enfermedad fue llevado a una ulterior perfección en 1882, con la publicación de "*Die Äthiologie der Tuberkulose"*, donde se comunica por primera vez la aplicación de los criterios que Henle había postulado en 1840. Estos criterios, que hoy van asociados al nombre de Koch, son los siguientes:

1. El microorganismo debe de estar presente en todos los individuos enfermos.

2. El microorganismo debe poder aislarse del hospedador y ser crecido en cultivo puro.
3. La inoculación del microorganismo crecido en cultivo puro a animales sanos debe provocar la aparición de síntomas específicos de la enfermedad en cuestión.
4. El microorganismo debe poder ser reaislado del hospedador infectado de forma experimental.

Fue asimismo Koch quien demostró el principio de especificidad biológica del agente infeccioso: cada enfermedad infecciosa específica está causada por un tipo de bacteria diferente. Estos trabajos de Koch abren definitivamente el campo de la Microbiología Médica sobre firmes bases científicas.

Durante las dos décadas siguientes la Microbiología experimentó una auténtica edad de oro, en la que se aislaron y caracterizaron muchas bacterias patógenas. La Alemania del Reich, que a la sazón se había convertido en una potencia política y militar, se decidió a apoyar la continuidad de los trabajos del equipo de Koch, dada su enorme importancia social y económica, creando un Instituto de investigación, siendo Koch su director en el Departamento de Salud. De esta forma, en la Escuela Alemana se aislaron los agentes productores del cólera asiático (Koch, 1883), de la difteria (Loeffler, 1884), del tétanos (Nicolaier, 1885 y Kitasato, 1889), de la neumonía (Fraenkel, 1886), de la meningitis (Weichselbaun, 1887), de la peste (Yersin, 1894), de la sífilis (Schaudinn y Hoffman, 1905), etc. Igualmente se pudieron desentrañar los ciclos infectivos de agentes de enfermedades tropicales no bacterianas que la potencia colonial se encontró en ultramar: malaria (Schaudinn, 1901-1903), enfermedad del sueño (Koch, 1906), peste vacuna africana (debida al inglés Bruce, 1895-1897), etc.

Por otro lado, la Escuela Francesa, nucleada en el Instituto Pasteur, se concentró en los estudios sobre los procesos infectivos, la inmunidad del hospedador, y la obtención de vacunas, sobre todo a raíz de la vacuna antirrábica ensayada por Pasteur (1885), contribuyendo al nacimiento de la Inmunología

RELACIONES ENTRE LA MICROBIOLOGÍA Y OTRAS CIENCIAS BIOLÓGICAS.

El auge de la microbiología desde finales del siglo XIX se plasmó, entre otras cosas, en el aislamiento de gran variedad de cepas silvestres de microorganismos, lo que suministró un enorme volumen de nuevo material biológico sobre el que trabajar, aplicándose una serie de enfoques que eran ya habituales en las ciencias naturales más antiguas; así, había que crear un marco taxonómico (con sus normas de nomenclatura) para encuadrar a los organismos recién descubiertos, era factible desarrollar trabajos sobre morfología y fisiología comparadas, sobre variabilidad y herencia, evolución, ecología, etc. De este modo la joven Microbiología fue objeto, en pocos años, de la utilización, a un ritmo acelerado, de los métodos taxonómicos y experimentales que habían ido surgiendo y madurando desde el siglo XVIII en los ámbitos de la "Historia Natural" clásica.

Aunque nos referiremos en otro apartado *(véase cap. 2)* a los avances de Taxonomía Microbiana, vale la pena reseñar aquí los esfuerzos tempranos para lograr un clasificación bacteriana por parte de Cohn (1875) y Migula (1894), que sustentaban su concepto de especie predominantemente sobre caracteres morfológicos. Pero hacia 1900 era evidente la arbitrariedad e insuficiencia de este tipo de clasificaciones, de modo que los intentos posteriores hicieron uso de caracteres

bioquímicos (Orma Jensen, 1909), o de una mezcla de rasgos morfológicos, bioquímicos, patogénicos y de tinción (Buchanan, 1915). El sistema de taxonomía bacteriana adquirió un nuevo impulso a partir de la 1ª edición del "*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology"* (1923), y de las propuestas de Kluyver y van Niel ("*Prospects for a natural system of classification of bacteria"*, 1936). En cuanto a la nomenclatura, no fue hasta 1958 en que cuajó un Código Internacional de Nomenclatura Bacteriológica, aunque ya se venía aplicando desde hacía tiempo el procedimiento tipológico para los microorganismos, con criterios similares a los de la Zoología y la Botánica.

El establecimiento de relaciones taxonómicas precisó el recurso a métodos cada vez más amplios y afinados de análisis genético, estructural o fisiológico. En un apartado anterior ya vimos las conexiones tempranas entre la Bioquímica y la Microbiología a propósito del descubrimiento de la base enzimática de las fermentaciones, lo cual abrió el camino para dilucidar el metabolismo energético microbiano, y para demostrar su similitud química con rutas metabólicas de organismos superiores. Otro paso importante en la percepción de la unidad bioquímica del mundo vivo deriva del descubrimiento de las vitaminas (término acuñado por Funk en 1911), al establecerse que determinados factores de crecimiento requeridos por algunos microorganismos eran químicamente similares a las vitaminas necesarias en la dieta de los animales, y que este tipo de compuestos representa precursores biosintéticos de coenzimas del metabolismo celular. Así pues, este tipo de investigaciones sentó claramente la idea de la unidad química de los seres vivos, independientemente de su encuadre taxonómico, y encauzó una buena parte de los trabajos bioquímicos hacia los microorganismos, dadas sus cualidades de facilidad de manejo y cultivo en laboratorio.

En cuanto a las conexiones de la Microbiología con la Genética, ya Beijerink, en 1900, tras analizar la teoría de la mutación de De Vries, había predicho que los microoganismos podrían convertirse en objetos de investigación más adecuados que los sistemas animales o vegetales. Pero las primeras conexiones entre ambas ciencias arrancan de la necesidad que hubo, a principios del siglo XX, de determinar la sexualidad de los hongos con fines taxonómicos. En 1905 Maire demostró la existencia de meiosis en la formación de ascosporas, y Claussen (1907) evidenció fusión de núcleos en Ascomicetos, mientras que Kniepp, hacia finales de los años 30 había recogido un gran volumen de información sobre procesos sexuales en Basidiomicetos. El sueco Lindegren (1936) realiza las primeras cartografías genéticas en cromosomas de *Neurospora*, durante su estancia en el laboratorio californiano de Morgan; este último, propugnador de la "teoría de los genes" (1926), confiaba desde hacía años en ampliar sus éxitos, logrados en *Drosophila*, hacia el estudio de la genética microbiana. En 1941, otros dos discípulos de Morgan, Beadle y Tatum, aislan mutantes auxotróficos de *Neurospora*, con lo que se inicia el estudio de la base bioquímica de la herencia, y convierten a este hongo en una valiosa herramienta de trabajo en esta línea de investigación.

Las estrategias diseñadas por Beadle y Tatum fueron aplicadas por Luria y Delbrück (1943) a cultivos bacterianos, investigando la aparición de mutaciones espontáneas resitentes a fagos o estreptomicina. La conexión de estos experimentos con las observaciones previas de Griffith (1928) sobre la transformación del neumococo, llevó a Avery y colaboradores (1944) a demostrar que el "principio transformante" portador de la información genética es el ADN. En 1949 Erwin Chargaff demuestra bioquímicamente la transmisión genética mediante ADN en *Escherichia coli*, y en 1952 Alfred Hershey y Martha Chase, en experimentos con componentes marcados de

fagos, ponen un elegante colofón a la confirmación de la función del ADN, con lo que se derribaba el antiguo y asentado "paradigma de las proteínas" que hasta mediados de siglo intentaba explicar la base de la herencia. De esta forma, la Microbiología experimental se sitúa en pleno centro del nacimiento de la Genética molecular, de la mano de los avances paralelos en Bioquímica (análisis por rayos X de la estructura del ADN debido a Maurice Wilkins y Rosalind Franklin, modelo de Watson y Crick de la doble hélice del ADN, etc.), dando origen esta confluencia a lo que se ha llamado la "Edad de Oro" de la Biología Molecular.

UBICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN EL MUNDO VIVO

Tras el descubrimiento de los microorganismos, a los naturalistas de la época les pareció normal intentar encuadralos dentro de los dos grandes reinos de seres vivos conocidos entonces: animales y plantas. De este modo, a finales del siglo XVIII las algas y los hongos quedaron en el reino *Plantae*, mientras que los llamados "infusorios" se encuadraron en el reino *Animalia*.

A mediados del siglo XIX se empezó a ver que esa clasificación era demasiado sencilla, y que el grupo de los infusorios era muy heterogéneo. En 1866 Haeckel, seguidor de Darwin, propone un famoso árbol filogenético con tres reinos:

- Animalia
- Plantae
- Protista: todos los seres vivos sencillos, sean o no fotosintéticos o móviles. Dentro de él consideraba los siguientes grupos:
  - Protozoos
  - Algas
  - Hongos
- Moneras (=bacterias)

Pero esta clasificación iba a ser puesta en entredicho a mediados del siglo XX, cuando las técnicas de microscopía electrónica y bioquímicas demuestran la gran diferencia de las bacterias respecto del resto de organismos. De hecho, ya en los años 60 se reconoce que esta diferencia representa la mayor discontinuidad evolutiva del mundo vivo. En 1974, el *Manual Bergeys* (la Biblia "oficiosa" de la clasificación bacteriana) considera que la clasificación al máximo nivel del mundo vivo debe reconocer la existencia de dos "Reinos":

- Procaryotae (material genético no rodeado de membrana nuclear)
- Eucaryotae (núcleo auténtico)

Pero en los años recientes, la incorporación a la taxonomía de los métodos de biología molecular, especialmente la secuenciación de ARN ribosómico y la genómica, está obligando a nuevos planteamientos. Para resumir, hoy se asume lo siguiente:

- Existen dos tipos de organización celular, la procariótica y la eucariótica.
- Dentro de los seres vivos con organización procariótica, existen dos grandes "dominios" o "imperios": *Bacteria* (las eubacterias o bacterias "clásicas") y *Archaea* (antes llamadas arqueobacterias)

- A su vez, el dominio eucariótico comprende numerosas líneas filogenéticas, muchas de ellas de microorganismos. Los mismos Protozoos es un grupo muy heterogéneo, que comprende líneas filogenéticas diversas y a veces muy separadas en el tiempo evolutivo.

El alumno ampliará todo esto cuando comience su estudio de la taxonomía microbiana.

BIBLIOGRAFÍA

- BALDRY, P. (1981): "La batalla contra las bacterias". Reverté, Barcelona.
- BROCK, T.D. (1961): "Milestones in Microbiology" (reedición de 1975). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- COLLARD, P. (1976): "The development of Microbiology". Cambridge University Press, Cambridge. Existe versión española: "El desarrollo de la Microbiología", Ed. Reverté.
- de KRUIJF, P. : "Cazadores de microbios". Biblioteca Científica Salvat.
- DEBRÉ, P. (1995): "Louis Pasteur". Barcelona, Círculo de Lectores.
- DUBOS, R. "Louis Pasteur". Biblioteca Salvat de Grandes Biografías.
- JAHN, I., R. LÖTHER, K. SENGLAUB (eds.) (1990): "Historia de la Biología". Labor, Barcelona. (Original alemán: VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1985).
- KRIEG, N.R. (1988): Bacterial classification: an overview. Can. J. Microbiol. 34: 536-540.
- MARGULIS, L., K.V. SCHWARTZ (1985): "Cinco Reinos". Labor, Barcelona.
- MURRAY, R.G.E. (1984): Higher taxa, or a place for everithing...?. En: "Bergey's manual of Systematic Bacteriology". Williams & Wilkins, Baltimore.
- STACKEBRANDT, E. (1988): Phylogenetic relationships vs. phenotypic diversity: how to achieve a phylogenetic classification system of the eubacteria. Can. J. Microbiol. 34: 552-556.

CAPITULO 2

ENCLAVE TAXONÓMICO DE LOS MICROORGANISMOS

Tras el descubrimiento de los microorganismos, se intentó encuadrarlos en los dos grandes reinos reconocidos por la Biología de la época, en base a los rasgos que entonces servían para distinguir entre plantas y animales. De este modo, a finales del siglo XVIII el reino Vegetal englobaba a las algas (inmóviles y fotosintéticas) y a los hongos (inmóviles y no fotosintéticos). Mientras que en el reino *Animal* Lamarck habilitó el grupo de los *Infusoria* para incluir los microorganismos que presentaban movilidad.

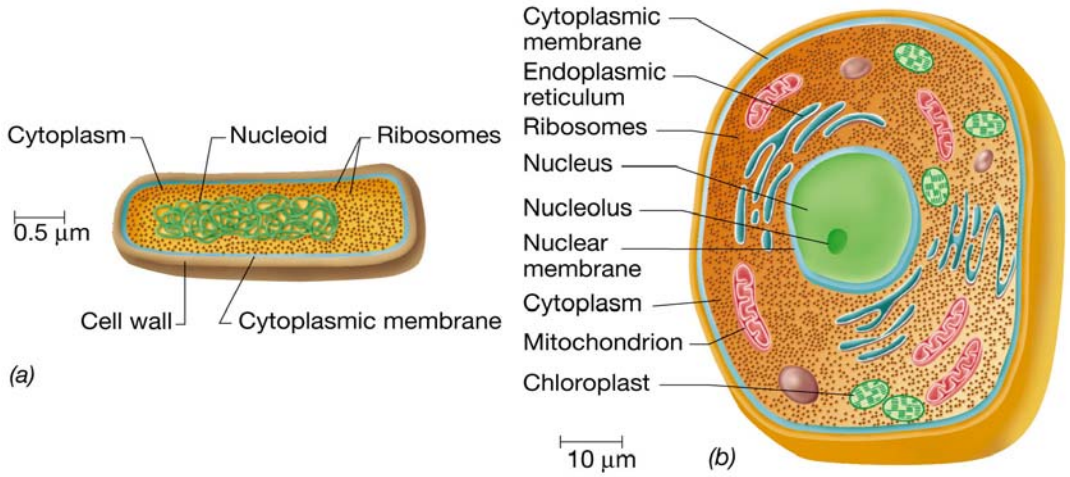
El biólogo francés Chatton , en su intento de establecer una filogenia universal, se había dado cuenta que la ausencia de un auténtico núcleo rodeado de membrana en las bacterias justificaba crear dos grandes reinos: el de los procariotas y el de los eucariotas.

PROCARIOTAS

Caracterizada porque su material genético (normalmente un solo cromosoma circular de ADN de doble hebra) no está recluido en un recinto rodeado de membrana, sino inmerso en el citoplasma; este cromosoma se replica de modo amitótico y la división celular suele ser por fisión binaria; carecen de orgánulos rodeados de membrana tales como mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplásmico, lisosomas, así como de undilipodios (cilios y flagelos de estructura fibrilar 9+2 y rodeados de membrana citoplásmica); sus ribosomas tienen un coeficiente de sedimentación de 70S; su citoplasma está envuelto por una membrana celular que sirve de barrera selectiva respecto del medio exterior, con funciones de transporte de nutrientes, producción de energía y de biosíntesis de ciertas moléculas.

La mayoría de las bacterias presentan, externamente a la membrana citoplásmica, una pared celular que, en el grupo de las eubacterias está basada en una macromolécula peculiar denominada peptidoglucano, mientras que en las arqueobacterias éste se ve sustituido por una variedad de tipos moleculares y estructurales exclusivos

Comparación célula procariota y eucariota



MICROORGANISMOS EUCARIÓTICOS

Los microorganismos eucarióticos son seres vivos unicelulares o pluricelulares, pero nunca con diferenciación en tejidos, pudiendo ser coloniales, cenocíticos o miceliares, y cuyo pequeño tamaño obliga a emplear el microscopio para observarlos y analizar su estructura.

Su organización celular eucariótica se caracteriza por su compartimentalización estructural y funcional: el material genético (ADN de doble hebra), repartido en varios cromosomas, y normalmente unido a proteínas básicas especiales, se alberga en un núcleo rodeado de membrana; pueden existir diversos orgánulos limitados por membrana: retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas, mitocondrias, etc; las células pueden disponer de uno o más orgánulos de locomoción (cilios y flagelos, denominados genéricamente como undilipodios), con una estructura de 9+2 fibrillas internas, envueltas por prolongaciones de la membrana citoplásmica.

Sus ribosomas, más grandes y complejos que los de procariotas, poseen un coeficiente de sedimentación de 80S, y el citoplasma contiene ciertos tipos de elementos citoesqueléticos (microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios.

Tradicionalmente se han venido considerando tres grupos dentro de los microorganismos eucarióticos: algas, protozoos y hongos, pero cada una de estas denominaciones no designa categorías filogenéticamente coherentes

ALGAS

Las Algas son eucariotas macro o microscópicos, normalmente aerobios y capaces de realizar fotosíntesis oxigénica por medio de cloroplastos (aunque algunos grupos presentan formas leucofíticas heterotrofas). Pueden ser unicelulares, cenocíticas, o pluricelulares (filamentosas, coloniales, etc.), pero nunca con diferenciación en tejidos, aunque muchas algas macroscópicas exhiben llamativas diferenciaciones morfológicas.

PROTOZOOS

Los Protozoos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos eucarióticos unicelulares no fotosintéticos (exceptuando la clase *Phytomastigophorea*, dentro del *subphulum Mastigophora*), muchos con capacidad de movimiento en medios acuosos por medio de pseudópodos o de undilipodios, y con numerosos representantes con formas de vida parasitaria

HONGOS

La denominación de Hongos es igualmente muy ambigua, ya que define genéricamente a seres heterotróficos cuya estructura vegetativa suele ser multinucleada y cenocítica, en muchos casos de crecimiento miceliar .

DIFERENCIAS ENTRE PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS

Datos relativos a:	Procariotas	Eucariotas
Genóforo o nucleoplasma	Un solo cromosoma circular cerrado covalentemente	Varios cromosomas lineares
	No existe membrana nuclear (no hay núcleo)	Existe membrana nuclear (núcleo auténtico)
	No hay histonas asociadas al ADN	Histonas asociadas al ADN
División del material genético	No hay mitosis	Hay Mitosis
Organización del citoplasma	No orgánulos eucarióticos	Orgánulos (mitocondrias, cloroplastos, RE, Golgi, centriolos, etc
	No citosqueleto (no corrientes citoplásmicas, ni mov. ameboide)	Citosqueleto (corrientes citoplásmicas
	Ribosomas tipo 70S	Ribosomas tipo 80S

CAPITULO 3

ESTUDIO DE LAS BACTERIAS

COMPOSICIÓN QUÍMICA BÁSICA DE LA CÉLULA PROCARIÓTICA

El contenido en agua de una célula vegetativa bacteriana típica es de un 70%, mucho menor que el de los eucariotas (que ronda el 90%).

Una célula de *Escherichia coli*, creciendo de forma equilibrada en un medio a base de glucosa y sales minerales, a 371C, tiene la composición:

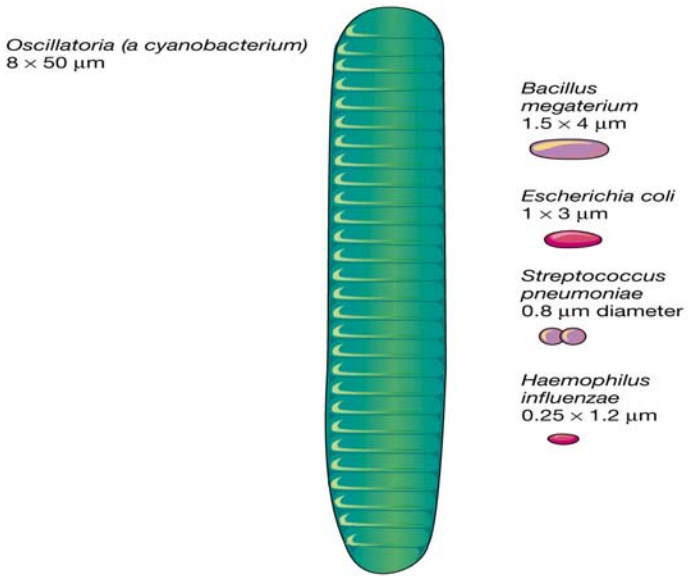
tipo de componente	Porcentaje sobre peso seco
proteína	55.0
ARN	20.5
ADN	3.1
Lípidos	9.1
Lipopolisacárido	3.4
Peptidoglucano	2.5
Glucógeno	2.5
total macromoléculas:	96.1
Pequeñas moléculas orgánicas:	2.9
Iones inorgánicos:	1.0

Obsérvese que:

- Las macromoléculas constituyen la porción mayoritaria de la masa celular (96%);
- Las proteínas representan más de la mitad de esta cantidad;
- Las bacterias poseen una proporción de ARN superior a la de los eucariotas;
- La mayor parte de los compuestos son semejantes a los de eucariotas, pero dentro de las macromoléculas encontramos dos que son **exclusivas de los procariotas** (concretamente, de eubacterias, aunque no de todas): lipopolisacárido (exclusivo de Gram-negativas); peptidoglucano (presente en eubacterias Gram-positivas y Gram-negativas).

TAMAÑO DE LAS BACTERIAS

El tamaño es un parámetro que está determinado genéticamente, pero los valores concretos para cada raza o cepa de bacterias vienen influidos por una serie de condiciones ambientales (nutrientes, sales, temperatura, tensión superficial, etc), tamaño de una bacteria típica como *Escherichia coli* (0.5 x 2 µ m) MICRA = 0.001mm



Las bacterias suelen presentar un pequeño tamaño, por lo general menor que el de una célula eucariótica típica. (Observarse en el esquema la comparación entre el tamaño de una bacteria típica como *Escherichia coli* (0.5 x 2 µm) y el de una célula eucariota).

Sin embargo, existe un amplio rango de tamaños, según las especies:

- Una bacteria grande es *Beggiatoa gigantea*, con un tamaño similar al de muchas células eucarióticas (40 µm).

Sin embargo, los auténtico "gigantes" entre las bacterias se han descubierto hace poco:

- En 1993 se desubrió una bacteria que mide 0,5 mm de longitud. Se trata de *Epulopiscium*, un comensal del intestino del pez cirujano.
- En 1999 se descubrió en un lago de Namibia una bacteria (a la que se bautizó como *Thiomargarita*) que alcanza los 700 µm.

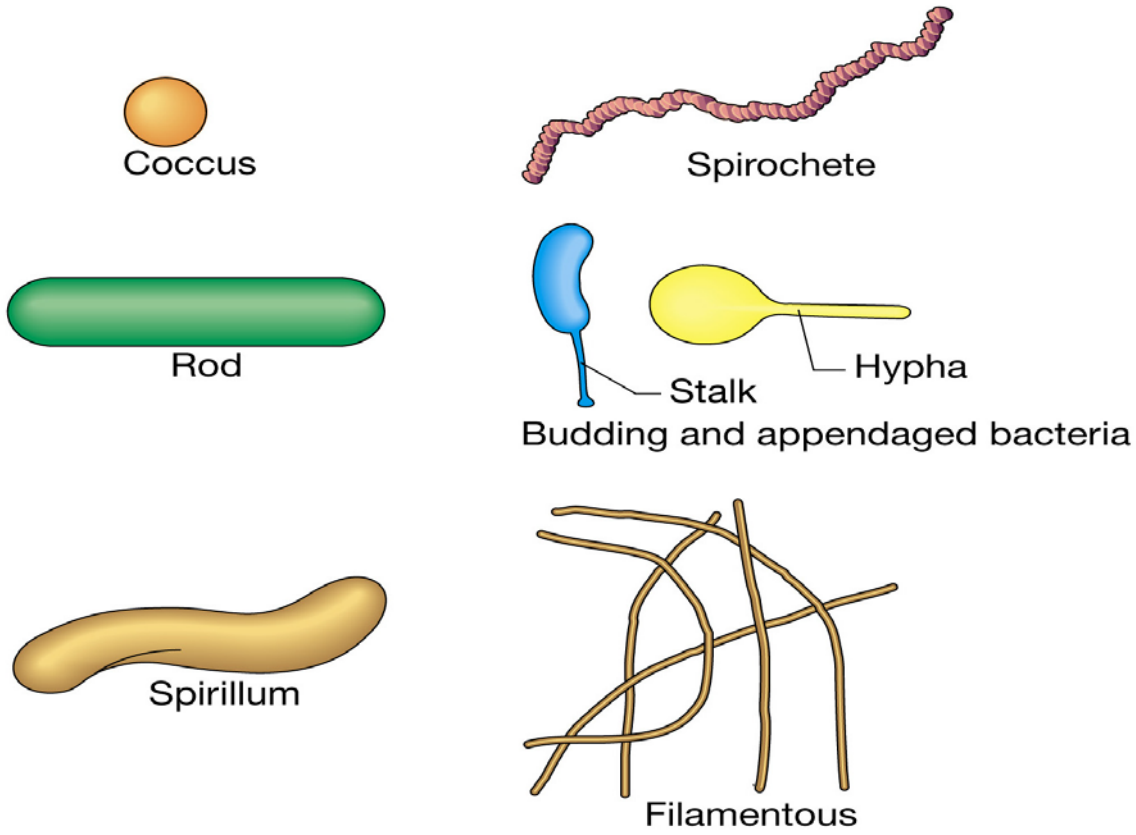
- *Bacillus megaterium* mide 1.3 x 3 µm.
- Una bacteria relativamente pequeña es *Haemophilus influenzae*, que mide 0.25 x 1.2 µm.
- Los organismos celulares cultivables más pequeños que existen son los micoplasmas, muchos de los cuales no superan los 0.2 µm de diámetro.
- Las nanobacterias o ultramicrobacterias miden en torno a 0.05 µm, pero la mayoría no se han podido cultivar, y sólo se pueden estudiar al microscopio.

FORMAS TÍPICAS

Los principales tipos de formas bacterianas son:

- cocos (células más o menos esféricas);
- bacilos (en forma de bastón, alargados),
- Que a su vez pueden tener varios aspectos:
  - cilíndricos
  - fusiformes
  - en forma de maza, etc.

- Atendiendo a los tipos de extremos, éstos pueden ser:
- redondeados (lo más frecuente)
- cuadrados
- biselados
- afilados



- espirilos: al igual que los bacilos, tienen un eje más largo que otro, pero dicho eje no es recto, sino que sigue una forma de espiral, con una o más de una vuelta de hélice.
- vibrios: proyectada su imagen sobre el plano tienen forma de coma, pero en el espacio suelen corresponder a una forma espiral con menos de una vuelta de hélice.
- Otros tipos de formas
- filamentos, ramificados o no
- anillos casi cerrados
- formas con prolongaciones (con prostecas)

Estos distintos tipos de morfologías celulares deben de haberse originado por mecanismos evolutivos, a saber, por selección y estabilización adaptativa frente a las distintas presiones ambientales presentes en diferentes nichos ecológicos

AGRUPACIONES BACTERIANAS

Las bacterias normalmente se multiplican por fisión transversal binaria. En muchas especies, las células hijas resultantes de un evento de división por fisión tienden a dispersarse por separado al medio, debido a la actuación de fuerzas físicas (movimiento browniano, cizallamiento, corrientes de convección, etc). Esto hace que al observar al microscopio una población de estas bacterias veamos mayoritariamente células **aisladas**. Pero en algunas especies las células hijas pueden permanecer unidas entre sí (al menos durante un cierto tiempo tras la división de la que proceden)

debido a que el tabique sea incompleto o a la existencia de capas mucosas que retienen juntos los productos de la división.

Si la tendencia a permanecer unidas es baja, tendremos agrupaciones de dos células, que dependiendo que sean de morfología esférica o alargada, se denominan como:

- **diplococos**
- **diplobacilos**

Si la tendencia a permanecer unidas es mayor (por más tiempo), nos encontramos con varias posibilidades, dependiendo del número de planos de división y de la relación entre ellos:

- Si los tabiques son paralelos entre sí (o sea, existe un solo plano de división): **estreptococos** (cadenetas arrosariadas de cocos) y **estreptobacilos** (cadenetas de bacilos).
- Si existe más de un plano de división, en el caso de cocos podemos encontrar tres posibilidades:
  - dos planos perpendiculares: **tétradas** (4 céls. en un plano) o múltiplos;
  - tres planos ortogonales: **sarcinas** (paquetes cúbicos);
  - muchos planos de división: **estafilococos** (racimos irregulares).

En el caso de bacilos, se pueden dar variantes adicionales, debido a la posibilidad de que se produzcan movimientos postfisionales (en algunos casos con desgarro):

- bacilos **en empalizada** o **en paquetes de cigarrillos** (debido a giros de 180^{o})
- dos bacilos en ángulo (en forma de **letra V o L**)
- varios bacilos formando "**letras chinas"**.

PLEOMORFIRMO Y FORMA DE INVOLUCION

PLEOMORFISMO.

Consiste en la variabilidad individual que se presenta en la diversidad de formas celulares con tamaño y aspecto distintas a las típicas, siendo independiente de la edad y estadio de desarrollo de las bacterias al tener una gran plasticidad protoplasmática. Se debe a la acción de diferentes factores como: Temperatura, medios nutritivos, acidez, metabolitos y agentes desinfectante.

INVOLUCION

Son alteraciones intensas y variadas cuando las condiciones del medio cambian intensamente en forma desfavorable, pueden ser debido a metabolitos tóxicos durante el crecimiento, escasez del medio o sustrato. Las afecciones a la bacterias se manifiestan con cambios de forma, perdida de movilidad no forman cápsulas.

FORMAS DE LAS COLONIAS BACTERIANAS

Aspecto cremoso, Reflejan la luz, Por lo regular son de forma concéntrica aunque hay géneros que son filamentosos o de forma rizoidales, algunas presentan coloración debido a la pigmentación, su crecimiento es elevado con respecto al medio de cultivo, algunas crecen pegadas al sustrato. Al microscopio se puede comprobar diferencia en su textura y forma de los bordes, el cual pueden ser lisos, rugosos, lobulados.

ESTRUCTURAS DE LA CELULA BACTERIANA

CÁPSULA

CONCEPTOS GENERALES

La cápsula se puede definir como una estructura superficial que presentan muchas bacterias en sus ambientes naturales, consistente en acumulación de material mucoso o viscoso, situado externamente respecto de la pared celular (o, en su caso, respecto de la capa S y de la vaina). Las cápsulas se pueden describir en función de:

- Su grado de asociación con la superficie celular subyacente (sobre todo pared):0
- **Integral**: íntimamente asociada con la superficie celular, a saber, con la P.C.
- **Periférica**: asociada a la sup. celular sólo en determinadas condiciones, pero finalmente se dispersa al medio exterior.

- Su consistencia y sus límites externos:
- **Rígida**: con suficiente consistencia estructural como para evitar la entrada de partículas como las de tinta china o nigrosina. Suele tener un límite exterior definido.
- **Flexible**: poca consistencia, de modo que no excluye partículas. Además, es deformable y carente de límites precisos.

Hay una cierta confusión en la nomenclatura de las cápsulas. Nosotros usaremos los siguientes conceptos:

- **Cápsulas** en sentido estricto son aquellas de tipo **rígido e integral.**
- **Capas mucilaginosas** son las de tipo **flexible y periférico.**
- **Glucocálix** es el conjunto de estructuras superficiales bacterianas, exteriores respecto de la pared celular, y compuestas de polisacárido.

Las cápsulas son estructuras inertes, "no vivas", carentes de papel activo (metabólico), pero que confieren a las bacterias importantes propiedades:

- Adhesión a células hermanas, generando microcolonias y consorcios.
- Adhesión a sustratos inertes o vivos, lo que les permite `la colonización de sus nichos ecológicos (p. ej., tejidos de organismos superiores)
- Protección contra agentes antibacterianos.

MÉTODOS DE OBSERVACION Y ESTUDIO

Su observación a microscopía óptica en fresco es difícil, ya que su índice de refracción es similar al del medio. Al ser una estructura muy hidratada (99% de agua), su observación con las técnicas habituales de microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB) revela una notable contracción de su estructura. Además, los colorantes habituales tienen poca afinidad hacia ella.

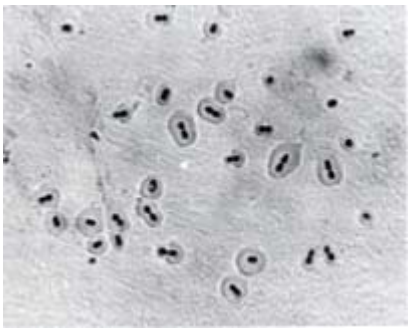


Imagen a microscopía óptica de la cápsula del neumococo (*Streptococcus pneumoniae*)

- **A microscopía óptica**: Se recurre a tinción negativa por medio de nigrosina o tinta china (resaltan como un halo transparente sobre el fondo oscuro del porta).
- **A microscopía electrónica**: Hay que recurrir a la estabilización previa de la estructura capsular (para evitar su contracción ulterior) por medio de anticuerpos anticapsulares o de lectinas. Tras esta operación, se procede a la tinción por una ferritina catiónica (p. ej., el rojo de rutenio), con afinidad hacia polianiones.

Para investigar más sobre la estructura de la cápsula se recurre igualmente a **difracción de rayos X** del polisacárido capsular.

Aislamiento del material capsular:

- El material de las capas mucosas (es decir, de las cápsulas flexibles y periféricas) es muy fácil de aislar, ya que tiende a dispersarse continuamente en el medio de cultivo. Por lo tanto, se puede aislar directamente de los sobrenadantes resultantes de la centrifugación del cultivo correspondiente.

- El material de las cáspulas rígidas e integrales puede aislarse tratando al cultivo con agua caliente o con ácidos o álcalis débiles.

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTRUCTURA

En general, el material capsular se compone de macromoléculas asimétricas que, en muchos casos constan de una serie de unidades repetitivas: polisacáridos o polipéptidos.

1) Cápsulas polisacarídicas

a) Heteropolisacáridos aniónicos, cuyas unidades repetitivas constan de azúcares (osas), aminoazúcares, ácidos urónicos, polioles (en muchos casos con radicales fosfato, formiato, succinato, etc.).

b) Homopolisacáridos neutros, como

i) levanos (polímeros de unidades de fructosa unidas por β(2 →6)

ii) dextranos

iii) celulosa

c) Alginatos (p. ej., en *Azotobacter, Pseudomonas*), consistentes en una alternancia de distintos tipos de ácidos urónicos.

2) **Cápsulas polipeptídicas** (sólo encontradas en el género *Bacillus*). Están formadas por glutamil-polipéptidos. Así p. ej., en *B. anthracis* el péptido es sólo de D-glutámico.

Las cápsulas y capas mucilaginosas bacterianas constituyen el llamado **antígeno K (capsular)**. Una misma especie puede constar de distintas razas, cada una de ellas con un Ag K distintivo, distinguible del de las demás por su composición química y su inmunorreactividad. Por ejemplo, en *Escherichia coli* se encuentran unos 70 tipos diferentes de especificidades de Ag K.

Las cápsulas polisacarídicas están unidas a la superficie subyacente, sobre todo a la pared celular.

La estructura es a base de una matriz muy hidratada, con una ordenación regular radial, o a veces, en láminas concéntricas.

FUNCIONES

En laboratorio, muchas bacterias suelen perder la capacidad de formar cápsulas al cabo de varios subcultivos. Así pues, la posesión o no de cápsula es algo que no afecta a la viabilidad de las bacterias. Pero en medios naturales, las cápsulas confieren a las bacterias una serie de propiedades, que dependen del nicho ecológico particular donde viva cada bacteria. Estudiaremos una serie de propiedades o papeles generales, comunes a todas las cápsulas, para concluir con algunos ejemplos de papeles específicos.

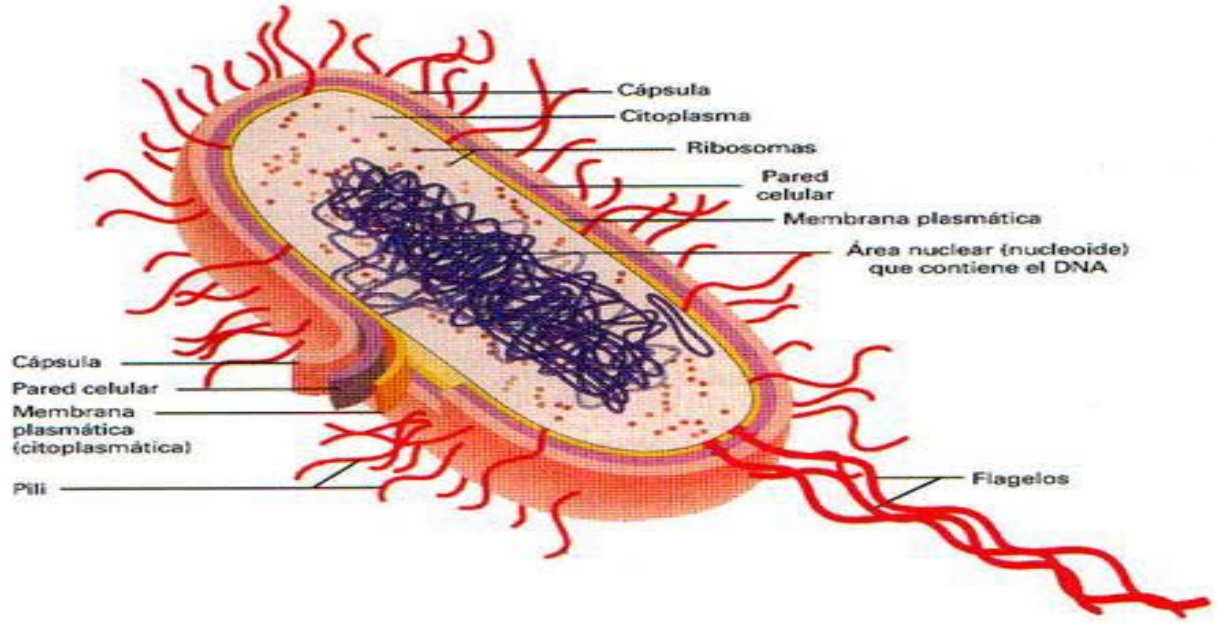
PROPIEDADES O PAPELES GENERALES

1) Mejora en las propiedades de difusión de nutrientes hacia la célula. Los polisacáridos extracelulares aniónicos funcionan como una resina de intercambio.
2) Protección **contra la desecación**
3) Protección **contra la predación** por parte de protozoos.
4) Protección **contra agentes antibacterianos**:
   a) contra metales pesados
   b) contra bacteriófagos
   c) contra células fagocíticas (p. ej., la cápsula del neumococo)
   d) contra detergentes
   e) contra anticuerpos
5) **Adhesión a sustratos**:
   a) Sobre sustratos inertes: propiedad importante, sobre todo en medios acuáticos. La mayoría de las bacterias acuáticas no son planctónicas, sino que viven en interfases (superficies, sedimentos), donde los nutrientes difunden mejor. Veamos cómo se produce el proceso:
      i) la bacteria se adhiere por la cápsula al sustrato;
      ii) la cápsula supone un aumento de superficie bacteriana, lo que se traduce en una mejora en la capacidad de absorber nutrientes;
      iii) la bacteria se multiplica, formándose una **microcolonia** donde los individuos están más protegidos frente a los agentes antibacterianos;
      iv) se forman **consorcios** con otros microorganismos. Ello permite una "alianza" o colaboración metabólica entre distintas especies, por la que se produce la degradación concertada de sustratos insolubles.

      Esta propiedad tiene una serie de importantes secuelas económicas:
      - corrosión y obstrucción de cañerías;
      - formación de placa dental y caries;

- formación de biopelículas en catéteres y prótesis quirúrgicas

b) Sobre sustratos vivos (tejidos de organismos superiores):
   i) En sistemas "normales" (efectos benéficos): La flora (= microbiota) autóctona que coloniza los epitelios de los animales superiores está englobada en glucocálix, estando las bacterias adheridas a la superficie tisular. Es decir, las cápsulas pueden actuar como **adhesinas** (moléculas para la adhesión). Otro ejemplo de ello lo da la microflora autóctona de la simbiosis del rumen
   ii) En sistemas patológicos: La cápsula es uno de los **factores de virulencia**, de los que depende el inicio de muchas infecciones por parte de bacterias patógenas. Si, además, la flora autóctona del individuo afectado está alterada o disminuida, esto supone un nicho ecológico vacío o perturbado, que puede ser colonizado por bacterias patógenas, en parte gracias a su glucocálix, que además las protege frente a surfactantes, células fagocíticas, anticuerpos, etc. Muchas cápsulas polisacarídicas no son reconocidas como material extraño por el sistema inmune, debido a que su estructura "mimetiza" estructuras del propio hospedador. Otras cápsulas sobrapasan la capacidad de respuesta del sistema inmune, o bien no activan eficientemente al sistema complemento.



PROPIEDADES PARTICULARES

Entre las propiedades conferidas por las cápsulas a algunas bacterias tenemos:

1) Como receptores para ciertos bacteriófagos.
2) En las bacterias tropicales fijadoras de N_2 atmosférico, de los géneros *Derxia* y *Beijerinckia* la gruesa y espesa cápsula actúa como barrera frente a la difusión de O_2, con lo cual evitan la inactivación de la enzima nitrogenasa.
3) En *Rhizobium* (fijador de N_2 en simbiosis con las raíces de leguminosas) el polisacárido extracelular actúa en la fase de reconocimiento entre la bacteria y la planta específica, a través de lectinas de esta última.
4) En *Acetobacter xylinum* la cápsula es a base de fibrillas de celulosa que retienen burbujas de aire, lo cual hace que la bacteria flote hasta su nivel adecuado.

CAPA "S" (CAPA SUPERFICIAL PARACRISTALINA)

Capa que, en muchas eubacterias (sobre todo Gram-positivas), envuelve a la pared celular, formada por el ensamblaje regular de subunidades idénticas de proteínas o glucoproteínas. En Gram negativas la capa S se une a la membrana externa, mientras que el Gram positivas lo hace al peptidoglucano. En muchas Arqueas es la única capa que rodea al protoplasto, por lo que en ellas cumple funciones de auténtica pared celular.

Disposición	Unidades Morfológicas
simetría binaria: filas oblicuas paralelas	dímeros
simetría cuadrangular:	tetrámeros
simetría hexagonal:	hexámeros

La unión entre los monómeros se realiza por enlaces no covalentes:

- hidrófobos
- iónicos, bien directos, o por mediación de cationes
- puentes de hidrógeno

Papel:

- En eubacterias provistas de pared celular. la capa S cumple varios papeles
- Como **tamiz molecular** protector que impide la entrada de agentes antibacterianos
- Parece que en muchos casos también protege frente a fluctuaciones iónicas y de pH, estrés osmótico, etc.
- En algunas bacterias patógenas, puede ser un factor de virulencia, al proteger a la bacteria frente al ataque del complemento y de los fagocitos.

- En Arqueas **da forma y rigidez** a muchas especies, ejerciendo papeles equivalentes al de una pared celular.
- En arqueas halófilas (p. ej., *Halobacterium*) la capa S de glucoproteína contiene glucopéptidos especiales, y está estabilizada por altas concentraciones de sodio, presentes en su nicho.
- En arqueas termoacidófilas (*Sulfolobus*) existen glucoproteínas en matrices hexagonales, ricas en aminoácidos polares (Ser, Thr), estando la capa S estabilizada por los bajos pH del medio.

VAINAS

Son estructuras tubulares (ramificadas o no) compuestas de un heteropolímero, a base de proteína, lípido y polisacárido, que engloban a conjuntos de células bacilares en cadenetas o filas. La vaina está en contacto con la pared celular subyacente, pero no hay enlaces entre ambas. En *Sphaerotilus* y *Leptothrix* las vainas se recubren de acúmulos de óxidos e hidróxidos de Fe y Mn. Conforme se dividen por fisión binaria, las células de los extremos del filamento van sintetizando nuevo material de la vaina que las va rodeando.

Las Arqueas *Methanothrix* y *Methanospirillum* poseen vainas proteicas con subunidades dispuestas en anillos, y son las que confieren la forma.

BOTONES DE ANCLAJE

Son acúmulos de mucopolisacáridos ácidos, segregados en puntos concretos de la célula, a nivel de pared celular, extremos de prostecas y pedúnculos o de tallos inertes en algún momento del ciclo de vida de ciertas bacterias. Facilitan la unión de las bacterias que los poseen a sus sustratos. Como ejemplo, los discos adhesivos ("holdfast") en el extremo de las prostecas de *Caulobacter* .

MEMBRANA CITOPLÁSMICA

Consiste en una bicapa lipídica, con los grupos polares (hidrófilos) hacia afuera, y las cadenas hidrofóbicas de ácidos grasos (o, en el caso de Arqueobacterias, de alcoholes) hacia adentro, ajustándose al modelo de mosaico fluido de Singer y Nicholson. Inmersas en esta bicapa se encuentran las abundantes proteínas, que pueden moverse lateralmente en el mosaico de moléculas de lípidos, igualmente dotados de una rápida movilidad. Parece ser que no existe movilidad de lípidos entre las dos capas.

La membrana citoplásmica es asimétrica (aunque no tanto como la membrana externa de Gram-negativas). Esto se traduce en el hecho de que muchos de los procesos que tienen lugar en la membrana sean **vectoriales** (tengan una dirección determinada).

FUNCIONES DE LA MEMBRANA CITOPLASMICA

La membrana citoplásmica de los procariotas es una notable estructura multifuncional (como uno podría esperar de la constatación del gran número de tipos de proteínas), siendo el sitio donde se producen muchos procesos metabólicos complejos, en un grado desconocido en el resto del mundo vivo.

De manera telegráfica, se puede decir que básicamente, la membrana citoplásmica bacteriana es una **barrera osmótica** (que mantiene constante el medio interno), pero que merced a sistemas de transporte, **permite selectivamente el paso de sustancias** entre el exterior y el interior, y que interviene, además, en **procesos bioenergéticos**, en la **biosíntesis de componentes de membrana, de pared y de cápsulas**, y en la **secreción de proteínas.** Desglosaremos brevemente estos diversos tipos de papeles de la membrana.

Participación en procesos bioenergéticos (obtención de energía)

Contiene todos los componentes requeridos para la transducción de energía y la producción de ATP, por procesos respiratorios. En el caso de una bacteria quimiotrofa, esto incluye:

* deshidrogenasas
* cadenas de transporte de electrones (con quinonas, citocromos, etc.)
* ATP-asas (ATP sintasas/hidrolasas)

Algunas bacterias fotosintéticas (de las Anoxifotobacterias) también incluyen este tipo de componentes en la membrana citoplásmica.

El funcionamiento de las cadenas de transporte electrónico (o de la ATP-hidrolasa) y la generación de un gradiente de protones a través de la membrana (potencial electroquímico o fuerza protón-motriz), el cual a su vez puede:
- generar ATP (desarrollo de un trabajo químico)
- promover transporte de ciertos nutrientes (trabajo osmótico)
- promover movimiento flagelar (trabajo mecánico).

RIBOSOMA

El ribosoma está compuesto de un 63% de ARN (que a su vez representa más del 90% del ARN total de la bacteria) y un 37% de proteínas. El ribosoma eubacteriano posee un coeficiente de sedimentación de 70S, frente al de 80S de los ribosomas citoplásmicos eucarióticos. Bajando la concentración de iones Mg^{++} cada ribosoma se disocia en sus dos subunidades: la pequeña (30S) y la grande (50S). *In vivo* esta disociación ocurre cada vez que se completa la síntesis de una molécula de proteína, para volver a unirse las dos subunidades al inicio del mensaje de otro gen.

EL NUCLEOIDE

El ADN es el material genético de los procariotas, al igual que del resto de seres vivos (celulares). Dicho ADN está contenido en una región concreta del citoplasma, denominada **nucleoide**, sin estar separado por membrana. El genoma es el conjunto de genes y secuencias de ADN de un organismo. En el caso de bacterias, el elemento obligatorio del genoma es el cromosoma, aunque es frecuente encontrar unidades de replicación autónomas llamadas plásmidos, que son dispensables (si se pierden, la bacteria sigue siendo viable).

PLÁSMIDOS

Se definen como elementos genéticos extracromosómicos con **capacidad de replicación autónoma** (es decir, constituyen replicones propios). Todos los plásmidos bacterianos estudiados son de ADN de cadena doble. La inmensa mayoría son circulares cerrados covalentemente (c.c.c.) y superenrollados (aunque en *Borrelia* y algunos Actinomicetos existen plásmidos lineares). Algunos plásmidos poseen, además, la capacidad de integrarse reversiblemente en el cromosoma bacteriano: en esta situación se replican junto con el cromosoma (bajo el control de éste), y reciben el nombre de **episomas**

APÉNDICES FILAMENTOSOS BACTERIANOS

FIMBRIAS O PILI

Son formaciones piliformes, no helicoidales, que no tienen nada que ver con el movimiento. Suelen ser más cortos, más delgados y más numerosos que los flagelos. Si bien surgen del citoplasma, no se conoce que posean estructuras de anclaje a la célula. Están formados por subunidades de una proteína llamada pilina.

Diferentes tipos de pili están asociados a diferentes funciones siendo las más conocidas la adherencia a superficies y la reproducción sexual de bacterias (conjugación; paso de plásmidos a través del pili de una célula a otra).

FLAGELOS

Los flagelos bacterianos típicos son largos apéndices filamentosos extracelulares, helicoidales, responsables del desplazamiento en medios líquidos de la mayor parte de las bacterias móviles. Aunque empleamos la misma palabra para designar a los orgánulos locomotores de procariotas y eucariotas, ambos son totalmente diferentes, tanto en estructura como en mecanismo de funcionamiento

OBSERVACIÓN

A microscopía óptica:
En preparaciones en fresco, no se pueden detectar los flagelos individuales, debido a su extrema delgadez (están ligeramente por debajo del límite resolutivo del microscopio). En cambio, la microscopía óptica de alta intensidad en campo oscuro sí logra discernir los flagelos. El microscopio de contraste de fases logra visualizar los penachos densos de flagelos de ciertas bacterias.

Pueden estudiarse fácilmente mediante impregnación argéntica en preparaciones previamente fijadas por procedimientos suaves que no destruyan la estructura (alcohol-éter) y con mordientes que la engruesan artificialmente: ácido tánico, sales de Al y Cr.

A microscopía electrónica:
Se suelen emplear las técnicas habituales de sombreado o tinción negativa con ácido fosfotúngstico

ASPECTOS MORFOLÓGICOS

Sobre células intactas, los flagelos se observan como filamentos helicoidales largos y finos. La longitud es variable (no está determinada de modo fijo): de 5 a 10 mm, pero su anchura o diámetro es constante y uniforme para cada especie: en *Escherichia coli* es de 20 nm.

El carácter helicoidal del filamento es propio e intrínseco: para cada especie, y dadas unas condiciones ambientales determinadas (sobre todo de pH) los parámetros de la hélice son fijos y característicos:
- Longitud de onda (p. ej., de 2-2.5 mm)
- Amplitud o anchura de la hélice (0.4-0.6 mm).

Algunas especies presentan simultánemante dos tipos de flagelos, con dos longitudes de onda diferentes (normalmente una es la mitad de la otra)l A este fenómeno se le denomina **biplicidad**.

El patrón de flagelación (es decir, el número y localización de los flagelos) varía entre especies, y reviste interés en la determinación taxonómica:
- Un solo flagelo: bacterias **monotricas**. Normalmente la inserción del flagelo (en bacterias bacilares) es polar o subpolar.
- Dos o más flagelos formando un penacho, normalmente en un polo: **lofotricas**. (por ejemplo, en *Spirillum volutans* hay más de 80 flagelos en el penacho).
- Dos penachos de flagelos, uno en cada polo: bacterias **anfitricas**.

- Flagelos repartidos por toda la superficie: bacterias **peritricas**. (Por ejemplo, *Escherichia coli* posee unos 10 flagelos, mientras que *Proteus mirabilis* posee cientos, dando aspecto muy denso a la disposiciòn de éstos).
- Ciertas bacterias presentan flagelos de inserción **lateral**, bien en penachos densos *(Selenomonas)*, bien diseminados *(Pectinatus)*.

Existe una serie de especies Gram-negativas *(Vibrio, Photobacterium, Bdellovibrio)* que poseen flagelos muy engrosados, debido a que están envueltos en una vaina que presenta continuidad con la membrana externa. Por otro lado *Pseudomonas rhodos* tiene un flagelo con vaina a base de subunidades de una proteína.

FILAMENTO

Es la parte visible en las preparaciones de células intactas, y representa hasta el 95% de la masa total del flagelo. Se puede aislar fácilmente por agitación mecánica, con ulterior ultracentrifugación diferencial en gradientes de densidad.

Desde un punto de vista geométrico se puede considerar como un cristal unidimensional, de longitud indeterminada (en enterobacterias, de entre 5-10 micras), pero con un diámetro uniforme de 20 nm, y como ya vimos unos parámetros de hélice propios de cada especie. Los flagelos silvestres en reposo suelen ser hélices levógiras, pero como veremos enseguida, experimentan **transiciones conformacionales** inducidas mecánicamente en ciertas fases del proceso de movilidad.

Si sometemos los flagelos aislados a agentes desnaturalizantes (calor, pH ácido, urea, etc) se desintegran en **subunidades de un solo tipo de proteína: la flagelina**.

Los cocos tienen forma esférica, los bacilos semejan pequeños bastones y las espiroquetas tienen forma espiral

Fotografías de cocos, bacilos y espiroquetas vistos al microscopio.

GLOSARIO

Cenocítico: sin paredes que separen a los núcleos en células.

Cianobacterias: bacterias unicelulares o filamentosas con capacidad **fotosintetizadora.**

Lipopolisacárido: (LPS) es un glicolípido de composición anfifílica y heterogénea que se encuentra en la **cara externa de la membrana externa** de la bacterias **Gram Negativas**. El peso molecular de los LPS, en distintas especies de bacterias, puede variar entre 2000 a 50000, y esto hace que sea difícil determinar completamente su estructura y conformación..

Mixobacterias: son aeróbicos, de morfología ameboide. Tienen división binaria. Habitan en la tierra y en lugares húmedos. Crecen en cultivo puro.Infectan a las cianobacterias, a algas y a hongos. Su relación con la presa es facultativa. No contactan con ella: producen la lisis del organismo mediante exoenzimas.

Nicho ecológico: En contraposición al hábitat, el término nicho ecológico no hace referencia a una localidad espacial, sino a una función de la especie o población en la comunidad. El nicho ecológico caracteriza la profesión de la especie. Puede partirse de la idea de que cada especie o población desempeña una función determinada que depende de los requerimientos nutritivos y fisiológicos, de las características genéticas, de las capacidades bioquímicas, y de las particularidades estructurales, así como de la tolerancia que presente frente a las condiciones ambientales.

Peptidoglicano: mucopéptido, malla o trama constituida por N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico. La presencia de este compuesto incrementa notoriamente la consistencia de la pared bacteriana y le permite resistir el aumento de la presión osmótica intracelular.

Prostecas: Son prolongaciones semirrígidas vivas, con un diámetro menor que el cuerpo celular. Es decir, son apéndices del cuerpo celular rodeados por membrana y pared celulares.

BIBLIOGRAFÍA

- DOW, C.S., R. WHITTENBURY (1980): **Prokaryotic form and function. En: "Contemporary microbial ecology"** (ed. D.C. Ellwood y otros), Academic Press, Londres, págs. 391-417.

- DWORKIN, M. (1991): **Prokaryotic diversity. En: *"The Prokaryotes"*** (2nd. edition). Springer Verlag, vol I., págs. 48-74.

- NEIDHART, F.C. (1987): **Chemical composition of *Escherichia coli*. En: "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology".** (F.C. Neidhart, ed.). American Society for Microbiology. Washington, D.C. (1987), págs. 3-6.

- SHAPIRO, J.A. (1988): **Las bacterias, organismos pluricelulares.** Inv. y Ciencia, **143** (agosto): 56-64.

- **ENLACES**

- http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/03_micro.htm

CAPITULO 4

MOVILIDAD BACTERIANA
LA ENDOSPORA BACTERIANA Y LA ESPORULACIÓN

FLAGELOS

Son filamentos helicoidales que se extienden desde el citoplasma a través de la pared celular son los responsables de la movilidad de las bacterias en los líquidos, llegando a velocidades de 100 µm / segundo, lo que equivale a 3000 veces la longitud de su cuerpo por minuto.

ESTRUCTURA DE UN FLAGELO

Un flagelo consta de tres partes:

- cuerpo basal
- gancho
- filamento.

Cuerpo basal

- El cuerpo basal que se encuentra dentro de la célula está compuesto por un cilindro central y varios anillos.
- Las bacterias Gram (-) tienen 2 pares de anillos, los exteriores unidos a la pared celular y los interiores a la membrana citoplásmica.
- En las bacterias Gram (+) sólo existe un par de anillos, uno está en la membrana citoplasmática y el otro en la pared celular
- Los flagelos funcionan rotando como un sacacorcho lo que permite a la bacteria moverse en los líquidos.
- El filamento está compuesto de moléculas de una proteína llamada flagelina.
- No todas las bacterias tienen flagelos (son raros en los cocos) pero en aquellas que los poseen (muchos bacilos y espirilos)

Clasificación de acuerdo a la posición y el número de flagelos

- Flagelos polares:
- monotricos,
- anfitricos
- lofotricos
- Flagelos peritricos

MOVIMIENTO

- Su movimiento puede ser aleatorio, o bien acercarse o alejarse de algo que hay en su ambiente como es buscar luz o alejarse del calor.
- También exhiben quimiotaxis que es un movimiento en respuesta a productos químicos del ambiente.
- Por ejemplo, las bacterias se acercan hacia niveles altos de atrayentes como son los nutrientes y se alejan de los niveles altos de sustancias inhibitorias como es el exceso de sales.

INTRODUCCIÓN A LA ESPORULACIÓN BACTERIANA

Algunas especies de bacterias Gram positivas (principalmente de los géneros *Bacillus, Clostridium, Sporosarcina* y *Thermoactinomyces*), disponen de una serie de estrategias adaptativas cuando se ven sometidas a privación de nutrientes en su medio ambiente:

1. en principio, intentan alcanzar un medio ambiente más propicio,
2. pero si finalmente la situación de hambre de nutrientes se mantiene, las células se preparan para un largo período de carencia nutricional. En este caso se embarcan en un proceso de diferenciación celular que conduce a la producción de una estructura especial llamada **endospora**, que es una forma de reposo, durmiente (**criptobiótica**, es decir de metabolismo prácticamente detenido), y que es capaz de resistir una amplia gama de agentes agresivos ambientales, físicos y químicos.

En el primer caso antes citado, las respuestas consisten en lo siguiente:

1. En principio, cuando las células de *Bacillus* están creciendo activamente en un medio rico en nutrientes, carecen de flagelos. Cuando los nutrientes comienzan a escasear, se induce la síntesis de flagelos à las células se mueven, en virtud de quimiotaxis positiva, hacia zonas donde detecten mayores concentraciones de nutrientes.
2. Si aun así, los nutrientes ricos vuelven a escasear, se inducen una serie de enzimas intracelulares y extracelulares, destinadas a aprovechar nutrientes menos ricos:
    a. enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que permiten aprovechar el acetato que previamente las células habían "desechado" como consecuencia de la utilización de la glucosa.
    b. enzimas hidrolíticas extracelulares destinadas a degradar polímeros presentes en el medio. Entre las enzimas excretadas encontramos proteasas, nucleasas, amilasas, fosfatasas, etc.à los monómeros obtenidos son transportados al citoplasma, donde son metabolizados o empleados en los procesos biosintéticos de mantenimiento.
3. En el segundo caso (apartado 2 citado antes), si la bacteria sigue pasando hambre, concretamente, si los niveles de fuentes de C, N, o P caen por debajo de un umbral, esto constituye una señal a la célula de que se avecina un largo período de privación de nutrientes. Entonces, la célula se implica en una serie de complejos cambios genéticos, metabólicos, estructurales, etc. (proceso de **esporulación**), que conducen a la diferenciación, en el interior de la célula vegetativa original, de una célula durmiente (la **endospora**). La célula-madre (o sea, la célula vegetativa original que generó la endospora) finalmente se autolisa, liberando la espora, que es capaz de permanecer en estado criptobiótico, durmiente, varios decenios, -incluso siglos. Las esporas son fácilmente diseminadas por el aire; cuando caen en medios ricos en nutrientes, se desencadena su **germinación**, se reinicia la actividad metabólica, de modo que cada espora genera una nueva célula vegetativa, capaz de divisón binaria, etc.

O sea, la esporulación se puede considerar como un proceso de supervivencia "en última instancia", la "última carta" que se juegan ciertas bacterias Gram positivas cuando se enfrentan a condiciones severas de hambre de nutrientes.

Significado adaptativo: Estas bacterias suelen vivir en medios nutricionalmente pobres (suelos, hierba seca, etc.). La esporulación es un proceso muy refinado que ha aparecido evolutivamente en una línea filogenética de bacterias Gram-positivas, y que les permite sobrevivir largos

períodos de carencia nutricional. (¡Atención!: La endospora bacteriana NO es una forma de resistencia).

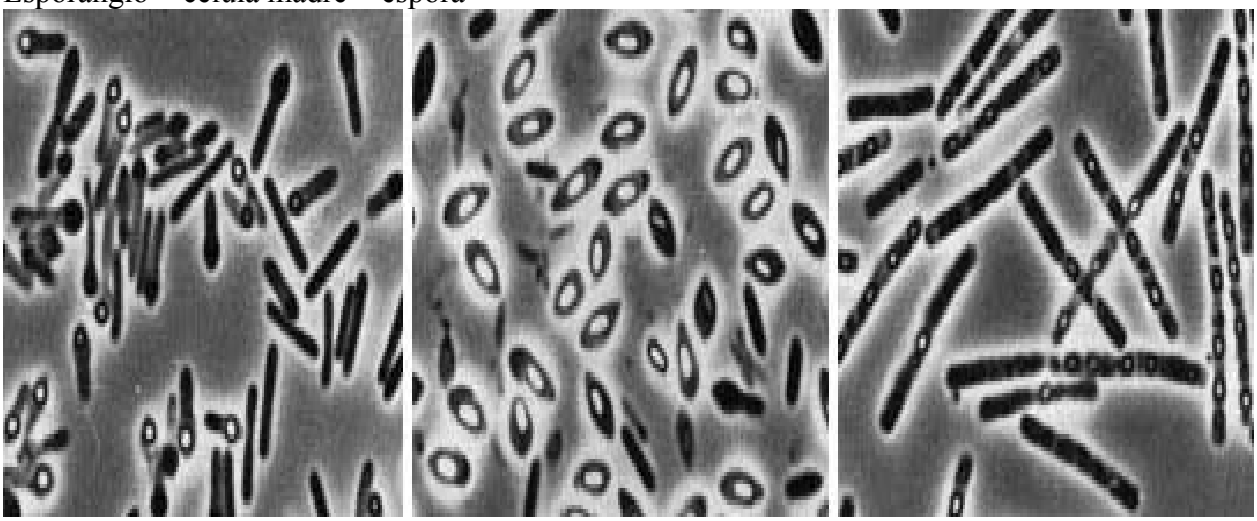
La esporulación bacteriana es **un sistema modelo** donde se pueden estudiar, con relativa sencillez, determinados **problemas biológicos más generales**: ¿qué bases moleculares y genéticas tiene la **diferenciación de un tipo de célula a otro tipo distinto**?, ¿cómo se regula el proceso **en función del tiempo y del espacio**?, ¿cómo se **"reparten los papeles" los tipos celulares implicados**?, etc. Por esta razón, presenta un enorme interés para los biólogos, interesados en escudriñar las bases íntimas de este tipo de importantes cuestiones, tan frecuentes en los organismos superiores.

Las endosporas son **formas de reposo** (y no formas reproductivas), que representan una etapa del ciclo de vida de ciertas bacterias, y que se caracterizan por una estructura peculiar, diferenciada respecto de las células vegetativas, por un estado metabólico prácticamente detenido, y por una elevada resistencia a agentes agresivos ambientales.

OBSERVACIÓN DE LAS ESPORAS

Al microscopio óptico, en fresco (sin teñir), aparecen como cuerpos esféricos, ovoides e incluso en algunas especies, cilíndricos, **muy refringentes**, libres, o aún incluidos en la célula vegetativa (célula madre).

Esporangio = célula madre + espora



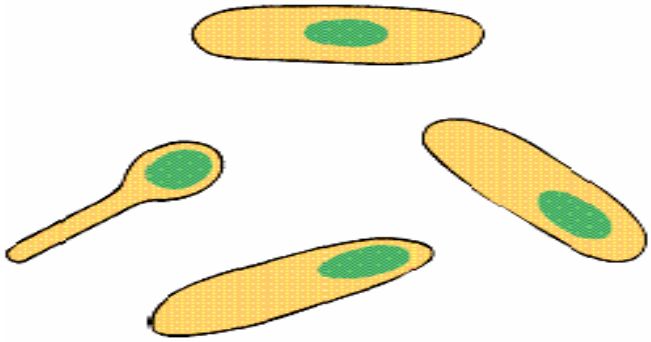
El tamaño relativo de la espora, y su situación en el esporangio, son criterios taxonómicos importantes en las bacterias esporulantes.

Según que el diámetro de la espora sea o no mayor que el de la célula vegetativa:

- Esporas deformantes
- Esporas no deformantes

Según la localización de la espora dentro del esporangio

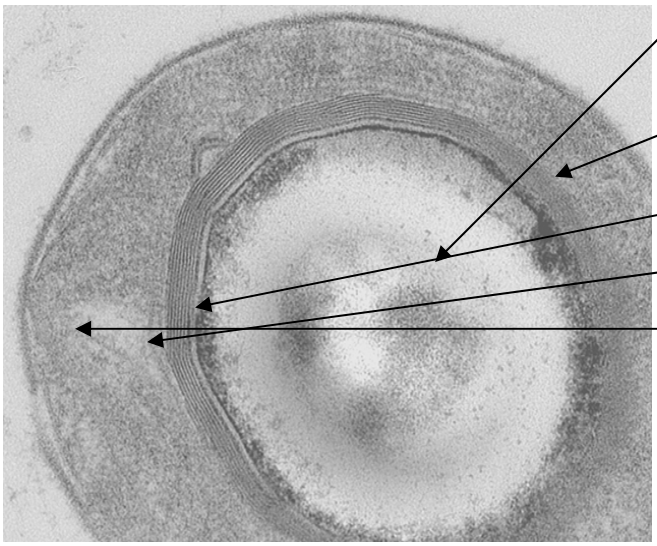
- Terminal
- Subterminal
- Central



Los esporangios deformantes de *Clostridium* son característicos:

- en forma de cerilla o palillo de tambor (plectridios)
- en huso (clostridios)

Tinción: No se tiñen por los colorantes normales. Hay que forzar por calor y/o mordientes (por ejemplo, tras teñir reforzadamente con fuchsina, resisten decoloración por alcohol-ClH). Otra tinción muy empleada es la reforzada con verde de malaquita.



Partes que comprende la endospora:
Protoplasto o núcleo ("core", en inglés), con la membrana citoplásmica de la espora (membrana esporal interna).
Pared de la espora (= **Germen de la pared de la futura célula vegetativa**
Corteza o córtex, rodeado externamente de la membrana esporal externa
Cubiertas.
Exosporio (no universal: las esporas de algunas especies carecen de él).

DESENCADENAMIENTO DE LA ESPORULACIÓN

Para que se produzca la esporulación, se necesitan dos condiciones previas:

1. los cultivos bacterianos han de estar **en buenas condiciones**;
2. cuando **cesa el crecimiento exponencial**, la mayoría de las células entran en esporulación, aunque el proceso no es sincrónico (hay desfases entre unas células y otras), de modo que en un lapso de tiempo relativamente breve (5,5-8 horas en *Bacillus subtilis*) casi todo el cultivo aparece en forma de esporas, habiendo desaparecido las células vegetativas. **La división celular típica de la fase de crecimiento exponencial y la esporulación son procesos mutuamente excluyentes.**

¿Qué **estímulo** es el responsable de desencadenar la esporulación? En principio, se pueden plantear dos hipótesis distintas:

a. la esporulación se debería a la acumulación de sustancias tóxicas o productos de desecho en el medio de cultivo;
b. la esporulación se debería a la carencia de algún tipo de nutriente.

Veamos cómo se demuestra que la hipótesis **a)** es falsa:

- Si se añaden sustancias tóxicas o moléculas de desecho a un cultivo joven, no se induce la esporulación (al contrario, ésta se ve inhibida).

Realicemos un sencillo experimento que apoya la hipótesis **b):**

- Tomemos un cultivo que aún esté en mitad de la fase exponencial; lo lavamos y lo transferimos a agua destilada o a un medio pobre en nutrientes. Comprobamos que al cabo de poco tiempo se induce la esporulación. Este fenómeno se puede calificar de **esporulación endotrófica**, es decir, estamos comprobando que la bacteria desencadena la esporulación porque debe de estar agotando algún nutriente interno (en el agua destilada no hay nutrientes, como es lógico, ni hay productos de desecho ni sustancias extrañas).

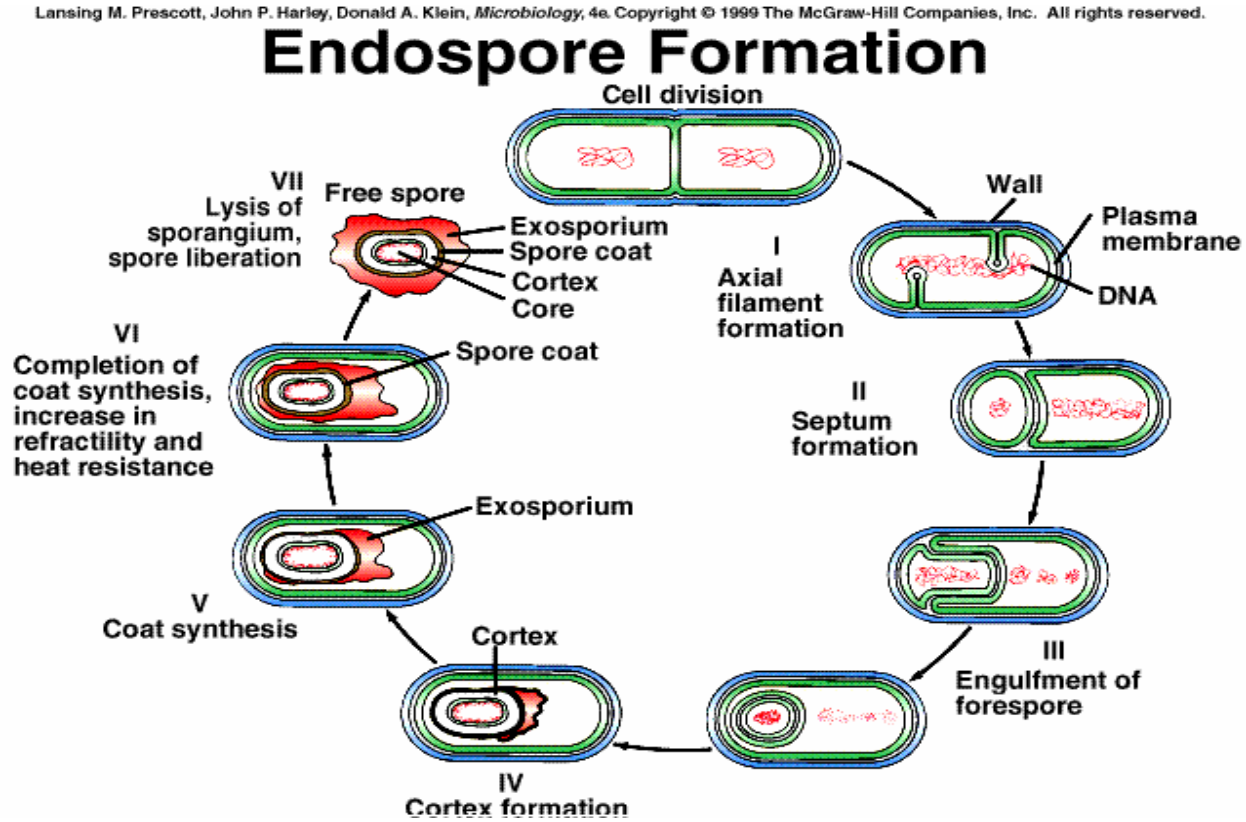
Es decir, **lo que detiene el crecimiento de estas bacterias y dispara la esporulación es un estado de inanición**, de carencia de nutrientes. Si en el experimento anterior añadimos el nutriente limitante al medio o al agua destilada antes de que la bacteria alcance la fase estacionaria, se puede evitar que el cultivo entre en esporulación (hasta que se agote el nutriente que se haga limitante).

El **nutriente limitante** que puede desencadenar la esporulación puede ser: la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno o incluso la carencia de fosfatos.

¿Qué ocurre a nivel intracelular para que se desencadene la esporulación? Esta es una de las facetas más oscuras aún. Se han venido manejando varias hipótesis:

1. Hipótesis del "gatillo disparador" único: Propugna la existencia de algún factor de la célula vegetativa que induce la esporulación al llegar el cultivo a un determinado estado, o bien la existencia de un factor vegetativo que está bloqueando la esporulación, pero que se inactiva cuando el cultivo llega a ese estado.
   Por ejemplo, se maneja la posibilidad de que se vaya produciendo durante el crecimiento vegetativo un nucleótido especial tetrafosforilado (ppGpp) que provocara una disminución de los niveles de NTP y NDP, lo que a su vez induciría los genes de la esporulación que hasta ese momento se habían mantenido silenciosos.
2. Hipótesis de los pasos múltiples acumulativos: Conforme la bacteria va cambiando de sustratos (conforme va agotando unos y recurriendo a otros) va acumulando una serie de cambios metabólicos internos, hasta que se llega a un determinado "umbral" o cambio clave, desencadenante.
3. Hipótesis "mixta" con elementos de las dos anteriores: El desencadenamiento sería resultado de una serie de cambios interconectados del metabolismo biosintético, pero además, en algún momento, entraría en juego algún evento regulatorio concreto. Existiría un "punto de no retorno" en el que el proceso se hace irreversible. Ese punto de irreversibilidad consiste, quizás, en la irreversibilidad acumulada de una serie de procesos individuales.

FASES DE LA ESPORULACIÓN



Vamos a estudiar la esporulación en *Bacillus subtilis* o en *B. megaterium*, dos de las bacterias esporuladas mejor investigadas, y que completan la esporulación al cabo de unas 7-8 horas de su inicio, a 37^0C. Se pueden distinguir siete fases consecutivas (además de la fase "0" anterior a la esporulación). Cada fase se denota con un número romano, y su duración en horas se expresa como subíndice de **t**, p. ej., t_2. Como veremos enseguida, cada fase se distingue por un(os) evento(s) citológico(s) peculiar(es) y por una serie de cambios bioquímicos propios:

Fase 0 (célula vegetativa):

- Al final del periodo de crecimiento exponencial, la célula vegetativa contiene dos cromosomas.

Fase I:

- El material genético (los dos cromosomas) se condensa constituyendo un **filamento axial** ancho, que ocupa el centro de la célula, según su eje longitudinal. Cada nucleoide está unido a uno de los extremos de la célula.
- En vez de iniciarse una división celular simétrica (con septo central), se forman dos **espículas de la pared celular cerca de los polos** hacia el interior, rodeadas de la correspondiente invaginación de la membrana citoplásmica. Cada espícula está señalando una zona donde se está formando el anillo de FtsZ (proteína contráctil de tipo tubulina.
- Se sintetizan y se liberan al medio **antibióticos** y varias **exoenzimas**. Una serie de proteasas se encargan del turnover de proteínas intracelulares, cuyos aminoácidos constituyentes serán empleados para sintetizar nuevas proteínas específicas de la esporulación.

Fase II

Se termina por formar un **septo transversal acéntrico**, cerca de un polo de la célula, por invaginación de la membrana citoplásmica, y deposición de nuevo PG entre las dos membranas adyacentes.

Cada nucleoide queda **segregado en uno de los dos compartimentos que se han formado**:

1. un cromosoma va al compartimento pequeño (compartimento de la **preespora**);
2. la otra copia del cromosoma va al compartimento grande (**célula madre**).

La segregación del cromosoma que queda en el compartimento de la preespora es muy interesante: Conforme el septo acéntrico se va cerrando, la mayor parte del cromosoma (un 70%) queda "fuera" de lo que será el límite entre preespora y célula madre: es decir, por sí mismo, sólo un 30% de ese cromosoma quedaría en la preespora.

Pero la proteína SpoIIIE actúa como una translocasa de ese cromosoma, y lo "empuja" al interior del compartimento de la preespora antes de que éste se cierre. Parece ser que el mecanismo guarda cierto parecido con el de transferencia de ciertos plásmidos conjugativos de *Streptomyces*.

En esta fase continúa la síntesis de los antibióticos y de las exoenzimas (serina-proteasas, metalo-proteasas, ribonucleasas, a-amilasa, etc).

Fase III

Independización del protoplasto de la preespora respecto de la célula madre. Para ello, lo primero que ocurre es la degradación selectiva del PG del septo que se había depositado en la fase II (esta degradación comienza por el centro, es decir, por donde se había cerrrado, y sigue hacia la periferia, y en ella intervienen los productos de varios genes). Entonces, la membrana citoplásmica de la célula madre va creciendo unidireccionalmente alrededor de la preespora, hasta que ésta queda libre en el citoplasma del esporangio.

Obsérvese que el citoplasma de la preespora queda **rodeado por dos membranas de polaridad opuesta**: la interior tiene la polaridad normal, pero la exterior, derivada del crecimiento de la membrana de la célula madre, tiene polaridad invertida

A partir de esta fase el turnover (renovación) de proteínas sólo tendrá lugar en la célula madre, deteniéndose en el compartimiento de la preespora.

Fase IV

Se forma casi por completo **la corteza** de la espora, por deposición de peptidoglucano entre las dos membranas. Sin embargo este PG aún no está "maduro".

También se deposita el peptidoglucano de **la pared celular** (que constituye el germen de la pared celular de la futura célula vegetativa).

Coincidiendo con esto, la preespora **adquiere su aspecto refráctil** al microscopio óptico en fresco.

Comienza la síntesis del **ácido dipicolínico (DPA)**, así como la **acumulación de Ca^{2+}**.

En las bacterias que lo poseen, en esta fase comienza la síntesis del exosporio.

Fase V

Los materiales de las **cubiertas** (que se habían ido sintetizando durante las fases II y III en el compartimiento de la célula madre), comienzan a depositarse por fuera de la membrana esporal externa.

Las cubiertas de *B. subtilis* están formadas por unos 14 tipos de proteínas, que se van ensamblando por etapas sucesivas, dando diversas capas, cada una con una composición de polipéptidos característica. La incorporación **postraduccional** de grandes cantidades de cisteína completará la estructura. El proceso no consiste en una deposición ordenada de capas desde el interior al exterior, sino más bien una construcción con andamiaje:

La proteína SpoIVA (que no es una proteína de la cubierta, propiamente dicha), se dispone sobre la membrana esporal externa, y recluta proteínas de andamiaje desconocidas.

Entonces se ensambla la proteína CotE en la parte externa de este andamio, y a su vez va a reclutar otras proteínas mayoritarias: proteína de cubierta interna (CotD), que dará la estructura que se ve laminar a microscopio electrónico, y proteína de cubierta externa (CotA) que interviene en las capas externas densas a los electrones.

Luego se van incorporando las demás proteínas de las cubiertas.

Al final de esta fase se **adquiere la resistencia al octanol**. Continúa la acumulación de DPA, que sigue secuestrando iones Ca^{++} (formación del quelato de dipicolinato cálcico, DPC).

La célula madre sintetiza el DPA, que es transportado a la preespora. El Ca^{2+} es captado por transporte activo por el esporangio, pero pasa por difusión facilitada desde la célula madre a la preespora, donde rápidamente es quelado por el DPA, lo que a su vez es un estímulo para la entrada de más Ca^{++}. Esta difusión facilitada es consecuencia de que la polaridad de la membrana esporal externa está invertida: el Ca^{++} no puede pasar por transporte activo.

Fase VI

La preespora **madura hasta espora**.

Madura la corteza (para generar el característico PG cortical, más laxo, con su bajo porcentaje de entrecruzamientos -por actuación de endopeptidasas- y la lactama del NAM).

Maduran las cubiertas.

El citoplasma de la espora se hace más **homogéneo y más denso a los electrones**.

Por una serie de razones aún no totalmente aclaradas, la espora se hace **resistente al calor y al cloroformo**.

Se adquiere **resistencia a las radiaciones ultravioleta (UV)**.

Se adquiere **resistencia a la lisozima**.

Fase VII
Liberación de la espora madura por autolisis de la célula madre.

En las bacterias que han producido exosporio, cuando la espora sale al exterior, este exosporio pierde su contenido de citoplasma (procedente de la célula madre), quedando como un saco vacío y plegado, unido a las cubiertas.

GERMINACIÓN DE LA ENDOSPORA

La germinación es el proceso por el cual una espora se convierte al estado vegetativo. Es mucho más rápida que la esporulación (dura unos 90 minutos). Podemos considerar en ella cuatro etapas, según el modelo de Foster y Johnstone (1990)

1. preactivación
2. activación
3. iniciación (o germinación en sentido estricto)
4. crecimiento ulterior (entrada en fase vegetativa)

PREACTIVACIÓN

Antes de que la espora esté en condiciones de germinar se requiere que sus cubiertas se alteren. En la naturaleza esto ocurre por erosión por envejecimiento progresivo. Artificialmente, en laboratorio, se puede recurrir a algún procedimiento para alterar esas cubiertas:

- tratando las esporas a altas temperaturas, pero inferiores a su inactivación (100oC durante unos minutos);
- por radiaciones ionizantes;
- por pH bajos;
- por tratamiento con sustancias que posean grupos -SH libres (p. ej., mercaptoetanol).

ACTIVACIÓN

La activación es una etapa aún reversible, desencadenada por un agente químico externo (germinante) presente en el medio. Este agente es variable según las especies:

- iones inorgánicos (Mn^{++}, Mg^{++});
- L-alanina en *B. subtilis*;
- glucosa u otros azúcares;
- adenina u otras bases nitrogenadas.

El germinante es detectado por un receptor alostérico a nivel de la membrana esporal interna. Una vez que dicho receptor se activa, adquiere una capacidad proteolítica específica que le permite romper una proenzima que hasta ese momento se encontraba unida covalentemente al PG de la corteza. La enzima resultante reconoce la lactama del NAM y comienza a hidrolizar el PG cortical. La consecuencia es que comienza a entrar agua al protoplasto de la espora, por lo que la espora pierde su característica refringencia, y se comienza a perder la resistencia al calor.

Durante toda esta etapa el **metabolismo está aún latente**.

INICIACIÓN O GERMINACIÓN EN SENTIDO ESTRICTO

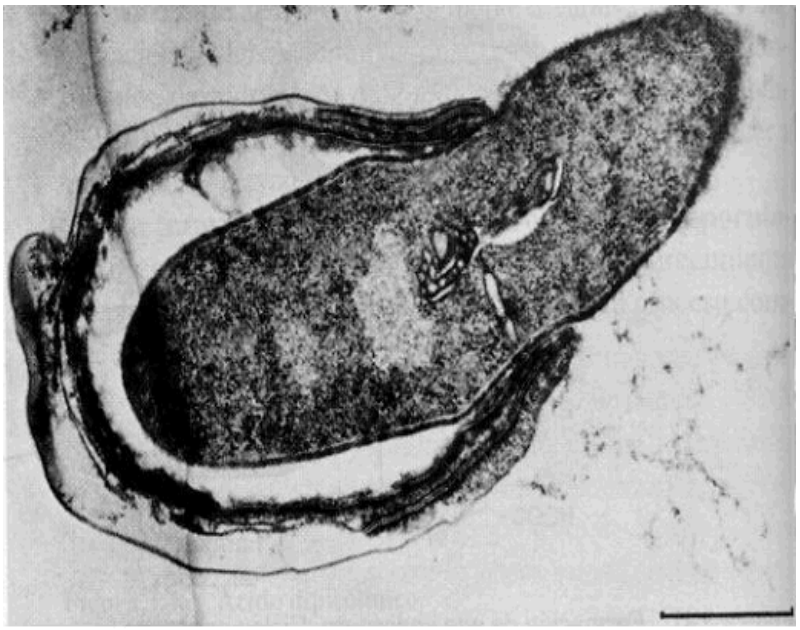
En esta etapa la germinación se hace ya irreversible, y se rompe definitivamente el estado de dormancia, si bien el metabolismo es endógeno (no depende todavía de sustancias externas). Los principales acontecimientos bioquímicos son:

- se pierde DPA, lo que supone pérdida de Ca^{2+}
- este Ca^{2+} pasa al córtex, donde neutraliza las cargas negativas --> se favorece la rehidratación del protoplasto y su hinchamiento, favorecido por la concomitante contracción del córtex, mientras continúa y se completa rápidamente la hidrólisis del PG cortical;
- el 3-fosfoglicérico (3-PG) se convierte en 2-PG, y éste en PEP, que a su vez dona su fosfato de alta energía para producir ATP;
- las pequeñas proteínas SASPs se hidrolizan por una proteasa específica (llamada GRP) que hasta ese momento estaba inactiva. De este modo los aminoácidos constituyentes de las SASPs se reutilizan para la síntesis de nuevas proteínas por parte de la pequeña dotación de ribosomas y demás moléculas accesorias;
- La ARN polimerasa comienza a sintetizar ARN (comienza la transcripción de genes vegetativos).

TERMINACIÓN Y CRECIMIENTO ULTERIOR

Aparece ya el metabolismo exógeno, de modo que la espora puede tomar nutrientes del exterior y metabolizarlos. Los eventos bioquímicos y estructurales más notorios son:

- se sintetiza ADN;
- el protoplasto crece aún más;
- la pared de la espora sirve como cebador (germen) para la producción de la pared de la célula vegetativa naciente;
- la célula vegetativa sale por rotura de las cubiertas, que puede ser de tipo polar o ecuatorial. Hay que aclarar que al salir, esta célula vegetativa se tiñe como Gram-negativa, y sólo adquirirá su típica grampositividad después de la primera división



Salida de la nueva célula vegetativa al final de la germinación. Observa la rotura de las cubiertas

PIGMENTOS BACTERIANOS

La intensidad de la pigmentación depende de la composición del medio y las condiciones de incubación como por ejemplo la temperatura.

Géneros que retienen el pigmento (cromóforas)
Serratia marcenses (color rojo)
Staphylococos aureus (color violeta)

Géneros que segregan pigmentos (cromóparos)
Pseudomona fluorescens (color verdoso)
Pseudomona aeruginosa (verdoso a pardo)
Azotobacter (color pardo)

Funciones de los pigmentos

Aceptor de hidrogeno en los procesos de la respiración, protege la bacteria contra las radiaciones ultravioletas natural., interviene en los procesos de síntesis y poseen acción antibiótica.

CAPITULO 5

NUTRICION BACTERIANA

CONCEPTOS BÁSICOS

Cualquier ser vivo, por su actividad vital (crecimiento, mantenimiento y reproducción) requiere continuos aportes de energía para reponer las pérdidas y, para que todo el sistema pueda funcionar. La nutrición es el proceso por el que los seres vivos toman del medio donde habitan las sustancias químicas que necesitan para crecer. Dichas sustancias se denominan nutrientes, y se requieren para los dos objetivos que comprende el metabolismo:

1. fines energéticos o catabolismo (reacciones de mantenimiento)
2. fines biosintéticos o anabolismo (reacciones plásticas).

Las biosíntesis de nuevos componentes celulares son procesos que requieren energía procedente del medio ambiente. Anteriormente señalamos los principales modos de captación y obtención de energía existentes en las bacterias.

El estudio de la nutrición microbiana se puede desglosar en varios apartados: así, podemos considerar los tipos de nutrientes requeridos, los aspectos cuantitativos, e incluso podemos abordar los aspectos ambientales (en cuyo caso entramos dentro del campo de la Ecofisiología). Igualmente podemos estudiar la aplicación práctica de la nutrición bacteriana, que se plasma sobre todo en el diseño de medios de cultivo para manejar los microorganismos en el laboratorio.

Es importante tener claros desde el principio una serie de conceptos y nomenclaturas relacionados con los principales tipos de nutrición bacteriana. Puesto que, como acabamos de ver, la nutrición presenta un aspecto de aprovisionamiento de energía y otro de suministro de materiales para la síntesis celular, podemos hablar de dos "clasificaciones" de tipos de nutrición:

Desde el punto de vista de los fines de **aprovisionamiento de energía**, las bacterias se pueden dividir en:

1. **litotrofas** (del griego *lithos* = piedra): son aquellas que sólo requieren sustancias inorgánicas sencillas (SH_2 , S0, NH_3, NO_2^-, Fe, etc.).
2. **organotrofas**: requieren compuestos orgánicos (hidratos de carbono, hidrocarburos, lípidos, proteínas).

Desde el punto de vista **biosintético** (o sea, para sus necesidades plásticas o de crecimiento), las bacterias se pueden dividir en:

1. autótrofas: crecen sintetizando sus materiales a partir de sustancias inorgánicas sencillas. Ahora bien, habitualmente el concepto de autotrofía se limita a la capacidad de utilizar una fuente inorgánica de carbono, a saber, el CO_2.
2. **heterótrofas**: su fuente de carbono es orgánica (si bien otros elementos distintos del C pueden ser captados en forma inorgánica).

Otros conceptos:

- **autótrofas estrictas**: son aquellas bacterias incapaces de crecer usando materia orgánica como fuente de carbono.
- **mixótrofas** son aquellas bacterias con metabolismo energético litótrofo, pero requieren sustancias orgánicas como nutrientes para su metabolismo biosintético.

Sean autótrofas o heterótrofas, todas las bacterias necesitan captar una serie de elementos químicos, que se pueden clasificar (según las cantidades en que son requeridos) como

- **macronutrientes** (C, H, O, N, P, S, K, Mg)
- **micronutrientes** o elementos traza (Co, Cu, Zn, Mo...)

En la naturaleza, estos elementos se encuentran combinados, formando parte de sustancias orgánicas y/o inorgánicas. Algunos de los nutrientes serán incorporados para construir macromoléculas y estructuras celulares; otros solo sirven para la producción de energía, y no se incorporan directamente como material celular; finalmente, otros pueden ejercer ambos papeles.

El mundo bacteriano, como conjunto, exhibe una gigantesca versatilidad metabólica de uso de nutrientes: desde autótrofos que obtienen su carbono por reducción del CO_2 y los demás elementos a partir de fuentes igualmente inorgánicas, hasta heterótrofos capaces de usar amplia gama de fuentes orgánicas de carbono.

A su vez, dentro de los heterótrofos, podemos encontrar muchos tipos de nutrición muy distintos, desde bacterias metilotrofas que sólo usan metano o metanol como fuente de carbono y energía, hasta los muy versátiles *Pseudomonas*, que pueden recurrir a degradar más de 100 tipos de fuentes de C, incluyendo sustancias tan "exóticas" como hidrocarburos alifáticos y cíclicos. De cualquier modo, entre los heterótrofos, una de las fuentes más típicas de carbono consiste en glucosa.

En los heterótrofos- organotrofos, los sustratos carbonados (con un nivel de oxidación no muy distinto del material celular -CH_2O-) entran simultáneamente al:

- **metabolismo energético** (o catabolismo, donde la fuente de C se transforma en CO_2, o en CO_2 junto con otras sustancias no totalmente oxidadas);
- **metabolismo plástico** (anabolismo = biosíntesis de nuevo material celular).

Aunque dentro del mundo de los procariotas se encuentre tanta variedad de nutriciones, las bacterias que pueden nutrirse solamente de sustancias inorgánicas sencillas (H_2O, CO_2, N_2, NO_3^{--}, NH_3, $SO_4^{=}$, fosfatos, etc.) son minoría, pero sus procesos metabólicos son muy interesantes. De hecho, existen tipos metabólicos que sólo han evolucionado en procariotas.

Como paradigma de esto citaremos los microorganismos **quimioautótrofos** (o **quimiolitoautótrofos**): obtienen su energía de la oxidación de sustancias inorgánicas sencillas, el carbono procede del CO_2, y el resto de elementos a partir de sales inorgánicas, por lo que pueden vivir en soluciones de sales minerales.

Lo habitual, sin embargo, es que muchas bacterias recurran, siempre que puedan, a tomar de los medios ciertos compuestos más complejos, ya que carecen de ciertas rutas biosintéticas

CLASES DE NUTRIENTES

Podemos clasificar los nutrientes en las siguientes categorías:

1. universales: agua, CO_2, fosfatos y sales minerales;
2. particulares
3. factores de crecimiento

NUTRIENTES UNIVERSALES

El agua

Las bacterias necesitan grandes cantidades de agua. De hecho, salvo excepciones, se pueden considerar como organismos acuáticos. Requieren cierto grado de humedad para crecer. Desde el punto de vista de sus posibles papeles, el agua es:

- el principal constituyente del protoplasto bacteriano;
- el medio universal donde ocurren las reacciones biológicas;
- un reactante en exceso (es decir, un producto resultante de algunas reacciones bioquímicas).

Las fuentes de agua pueden ser:

- endógena: procedente de procesos de oxido-reducción;
- exógena (la más importante): procedente del medio, y que difunde a través de las membranas.

Ahora bien, no toda el agua de un ambiente está disponible para la bacteria:

- Existen determinadas sustancias y superficies que absorben y adsorben (respectivamente), de modo más o menos intenso, moléculas de agua, dejándolas inasequibles a la bacteria.
- Los solutos disueltos en agua (p. ej. , sales, azúcares) tienen afinidad por las moléculas de H_2O que los rodean, por lo que éstas tampoco estarán a disposición del microorganismo.

El anhídrido carbónico (CO_2)

El anhídrido carbónico es requerido por todo tipo de bacterias:

Las autótrofas lo requieren como fuente de carbono, y lo reducen usando como fuente de energía la luz (en el caso de las fotoautótrofas) u oxidaciones de determinadas sustancias inorgánicas (los quimioautolitotrofos).

Las arqueobacterias metanogénicas pueden usar el CO_2 como aceptor de los electrones procedentes de la oxidación del H_2, proceso por el que obtienen su energía:

$CO_2 + 4H_2$ ---------> $CH_4 + 2H_2O$ ($DG'0<0$)

Los heterótrofos, aunque no usan el CO_2 como fuente de C ni como aceptor de electrones, necesitan pequeñas cantidades para las carboxilaciones en determinadas rutas anabólicas y catabólicas.

El origen del CO_2 puede ser:

- **endógeno**: procedente de descarboxilaciones que ocurren al degradar la fuente orgánica de carbono;
- **exógeno**: el CO_2 de la atmósfera o disuelto en las soluciones acuosas.

Normalmente, las bacterias crecen a la concentración de CO_2 atmosférico (0.03%), pero algunas bacterias (*Neisseria*, *Brucella*), cuando se aíslan por primera vez, requieren atmósferas enriquecidas, con 5-10% de CO_2. Ello parece deberse a que poseen alguna enzima con baja afinidad hacia el CO_2; sin embargo, tras varios subcultivos, suelen adaptarse a crecer a tensiones normales.

Fósforo

Suele requerirse en forma de fosfatos, sea orgánico o inorgánico. Las bacterias que pueden usar los fosfatos orgánicos (merced a la posesión de fosfatasas) no dependen absolutamente de ellos, ya que pueden recurrir igualmente a los fosfatos inorgánicos. Los fosfatos orgánicos son hidrolizados por fosfatasas extracelulares o (en las Gram-negativas) periplásmicas (p.ej., la fosfatasa alcalina).

El fósforo se usa principalmente para la síntesis de los ácidos nucleicos y los fosfolípidos, pero aparece también en coenzimas y en proteínas.

Sales minerales

Las sales minerales son la fuente de aniones (p. ej. el Cl^-) y de cationes para la célula. Los siguientes cationes, concretamente, se necesitan en cantidades relativamente grandes: K^+, Mg^{++}, Ca^{++}, Fe^{++}.

El ión potasio (K^+):

- El ión potasio interviene en la activación de una variedad de enzimas, incluyendo las que participan en la síntesis de proteínas.
- En Gram-positivas está asociado con los ácidos teicoicos de la pared.

El ión magnesio (Mg^{++}):

- estabiliza ribosomas, membranas y ácidos nucleicos;
- como cofactor en muchas reacciones, especialmente las que implican transferencia de grupos fosfato. Por ejemplo, en las reacciones que requieren ATP, el Mg^{++} puede unir la enzima al sustrato durante el mecanismo de acción de la primera.
- Participa de las clorofilas y bacterioclorofilas de bacterias fotosintéticas.

El ión calcio (Ca^{++}): es un cofactor de ciertas enzimas, como proteinasas.

El hierro (principalmente como ión ferroso, Fe^{++}) suele estar acomplejado en la naturaleza, formando sales insolubles. Las bacterias disponen de una serie de moléculas, denominadas sideróforos, capaces de captar ese hierro. El hierro:

- participa en muchas moléculas implicadas en procesos de respiración, como citocromos y ferroproteínas no hémicas (proteínas con Fe-S);
- interviene como cofactor en ciertas enzimas.

- forma parte de los magnetosomas, de los cuales depende el comportamiento magnetotáctico capacidad de orientarse en el campo magnético de ciertas bacterias. Se encuentra bajo la forma de magnetita (óxido de hierro ferromagnético) Fe_3O_4

Aparte de estos iones que se requieren en cantidades relativamente grandes, las bacterias necesitan minúsculas cantidades de otros elementos (**oligoelemento**s), a los que también se denomina como micronutrientes o elementos traza.

El manganeso (Mn^{++}) es un cofactor de ciertas enzimas, y a veces puede sustituir al Mg^{++}.

El cobalto (Co^{++}) se requiere casi exclusivamente para la vitamina B12 (de hecho, si suministramos esta vitamina al medio, la bacteria se vuelve independiente del Co^{++} libre).

El zinc interviene en la estabilización de complejos enzimáticos como las ADN- y ARN-polimerasas.

El molibdeno participa en las llamadas molibdoflavoproteínas, implicadas en la asimilación de nitratos. Por otro lado, participa como cofactor, junto con el Fe, en el complejo nitrogenasa de las bacterias fijadoras de N_2 atmosférico.

El níquel participa en hidrogenasas, enzimas que captan o liberan H_2.

FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son moléculas orgánicas específicas que, en muy pequeña cantidad, algunas bacterias necesitan para crecer. Salvo excepciones no tienen función plástica (no son sillares de macromoléculas) ni sirven como fuente de energía. Suelen ser coenzimas o sus precursores, vitaminas, que determinadas bacterias no pueden fabricar por sí mismas, al carecer de parte o toda de una ruta biosintética.

Ejemplos:

- las bacterias del género *Brucella* requieren como factores de crecimiento en sus medios de cultivo la biotina, niacina, tiamina y ácido pantoténico.
- *Haemophilus* necesita suplementos de grupos hemo y piridín-nucleótidos.

En la siguiente tabla se muestran algunas de las vitaminas y cofactores requeridos por algunas bacterias:

Factor o vitamina	Funciones principales
p-aminobenzoico (PABA)	Precursor del ácido fólico
Ácido fólico	Metabolismo de compuestos C1, transferencia de grupos metilo.
Biotina	Biosíntesis de ácidos grasos; fijación de CO_2
Cobalamina (vitamina B12)	Reducción y transferencia de compuestos C1; síntesis de desoxirribosa
Niacina (ácido nicotínico)	Precursor del NAD; transferencia de electrones en reacciones redox
Riboflavina	Precursor de FAD y FMN
Ácido pantoténico	Precursor de la CoA
Tiamina (vitamina B1)	Descarboxilaciones; transcetolasas
Complejo B6 (piridoxal, piridoxamina)	Transformaciones de aminoácidos y cetoácidos
Grupo Vitamina K, quinonas	Transportadores de electrones (ubiquinonas)

MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

El conocimiento de la nutrición microbiana permite el cultivo de los microorganismos en el laboratorio. Como acabamos de ver, en general, todos los microorganismos tienen parecidos requerimientos de macro- y micronutrientes, aunque ha quedado claro que la forma en que cada nutriente es captado puede variar mucho entre unas bacterias y otras, así como la cantidad relativa de cada nutriente. Los microbiólogos, en su trabajo cotidiano, están acostumbrados a manejar multitud de "recetas" o fórmulas correspondientes a muchos tipos de medios de cultivo.

Un medio de cultivo es una solución acuosa (bien como tal, o bien incorporada a un coloide en estado de gel) en la que están presentes todas las sustancias necesarias para el crecimiento de un (os) determinado (s) microorganismo (s). Los medios de cultivo se pueden clasificar, en primera instancia, en tres grandes tipos:

1) **Medios complejos o indefinidos**: su composición química exacta se desconoce, ya que son el producto de realizar infusiones y extractos de materiales naturales complejos:

Ejemplos:

- Extracto de carne
- Extracto de levadura
- Autolizado de levadura
- Peptona de carne o de soja
- Digeridos de caseína (de la leche).
- Digeridos de embrión de semilla de algodón

Con ellos se logra un tipo de medio rico nutricionalmente, aunque indefinido químicamente. Si lo que pretendemos simplemente es obtener un buen crecimiento bacteriano, este tipo de medios es ideal, ya que su confección es fácil y rápida (basta pesar una cierta cantidad del extracto desecado, suministrado por casas comerciales, disolverlo en agua y esterilizar en autoclave, antes de inocular e incubar la bacteria con la que queramos trabajar). Estos medios contienen fuentes variadas de C y N orgánicos, sales minerales y micronutrientes. Sin embargo, con ellos no podemos tener un control nutricional preciso, ya que desconocemos la composición química y proporción exacta de los distintos nutrientes.

2) **Medios sintéticos o definidos**: se obtienen disolviendo en agua destilada cantidades concretas de distintas sustancias químicas puras, orgánicas y/o inorgánicas. La composición concreta de un medio sintético dependerá de la bacteria que queramos cultivar: lógicamente, un medio definido para una bacteria con grandes capacidades biosintéticas será más sencillo que el medio definido de otra bacteria con menores posibilidades biosintéticas.

3) En tercer lugar, podemos fabricar un tipo de medio "mezcla" de los anteriores, denominado medio semisintético: llevan algunas sustancias químicas cuya naturaleza y cantidad conocemos, junto con sustancias de naturaleza y composición indefinidas.

Cualquiera que sea el tipo de medio, de los tres que acabamos de citar, podemos elaborar dos tipos de "versiones", según su estado aparente:

- medios líquidos
- medios sólidos: derivan de los líquidos simplemente añadiendo a la solución nutritiva un coloide en estado de gel, que solidifica (da consistencia) a esta solución.

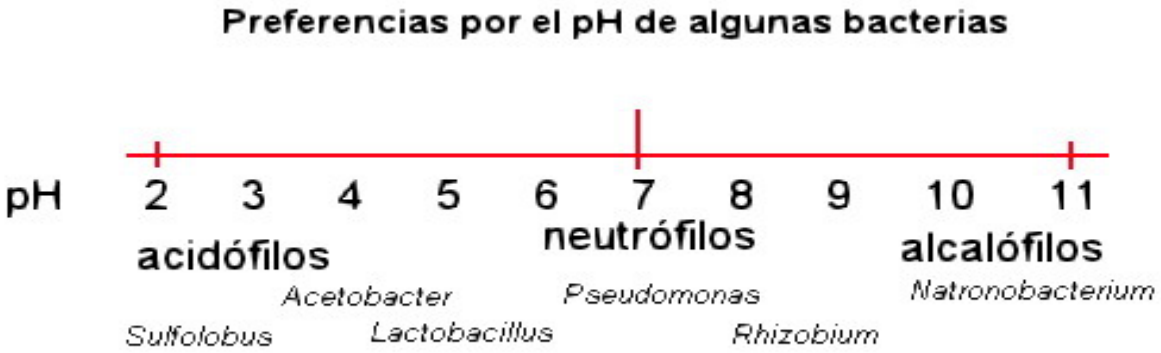
En los primeros tiempos de la Bacteriología sólo se conocía como sustancia gelificante incorporable a los medios la gelatina. Sin embargo, presenta muchos inconvenientes, ya que funde a 25^{o}C (por encima de esta temperatura el medio se licua), y además, muchas bacterias presentan gelatinasas que hidrolizan la gelatina.

El gelificante más usado es el agar-agar, extraído de algas rojas (p. ej. *Gelidium*), del cual existen versiones más o menos purificadas (las más puras están más enriquecidas en el polisacárido agarosa; son las que se emplean para los medios definidos, con objeto de evitar la introducción de sustancias "contaminantes" inadvertidas que falseen las interpretaciones sobre el comportamiento nutricional de la bacteria).

El agar presenta la gran ventaja de que una vez gelificado, no funde hasta cerca de los 100 ^{o}C, lo que permite su uso para la inmensa mayoría de bacterias, que son mesófilas.

Para cultivar ciertas bacterias (sobre todo los quimioautótrofos) se suele recurrir a un gelificante inorgánico, el silicagel o gel de sílice.

Finalmente, introduciremos otra serie de conceptos relativos a medios de cultivo, que al igual que los anteriores, serán tratados con la suficiente amplitud en las sesiones de clases prácticas:



Algunos tipos de medios de cultivo

Medios selectivos son aquellos que permiten seleccionar un tipo (o unos pocos tipos) de microorganismos. En el laboratorio se emplean mucho medios selectivos sólidos que incorporan ciertas sustancias que inhiben el crecimiento de ciertas bacterias, pero permiten el crecimiento de otras. (P. ej. medios que llevan violeta cristal inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas).

Medios diferenciales son aquellos que permiten distinguir a simple vista dos o más tipos de bacterias en función de su distinto comportamiento respecto de algún nutriente del medio. Ese comportamiento diferencial se traduce normalmente en un viraje de color de una sustancia indicadora presente en el medio.

Ejemplos:
En el medio EMB (eosina-azul de metileno) ciertos tipos metabólicos de bacterias producen cambios de color y precipitación de sales cuando producen ácidos por fermentación de ciertas fuentes de carbono.

El medio llamado agar-sangre lleva un 5% de sangre de caballo o carnero, lo cual revela la capacidad (y el tipo) de hemólisis de ciertas bacterias.

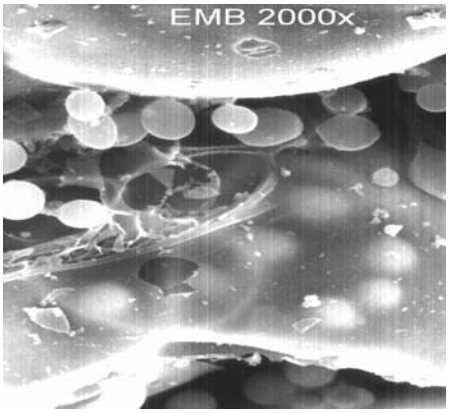
Algunos medios son simultáneamente selectivos y diferenciales.
P. ej., el agar de MacConkey, que el alumno manejará en los prácticos. Se trata de un medio de color rosado y transparente, que posee, entre otras sustancias, lactosa, peptonas, el colorante vital rojo neutro, sales biliares y violeta cristal.

Este medio es selectivo contra muchas bacterias Gram-positivas debido al violeta cristal, y también contraselecciona muchas Gram-negativas debido a las sales biliares (que son agentes tensioactivos que desorganizan muchas membranas externas). En cambio, las Enterobacterias están evolutivamente adaptadas a soportar sales biliares en su hábitat natural (el intestino de vertebrados superiores), y pueden crecer en este medio. En su faceta de medio diferencial, el agar MacConkey permite visualizar dos tipos de Enterobacterias según que puedan o no fermentar la lactosa, con producción de ácidos. Las bacterias fermentadoras de lactosa (Lac^+), excretan al medio gran cantidad de ácidos orgánicos, lo que provoca que sus colonias, y sus alrededores

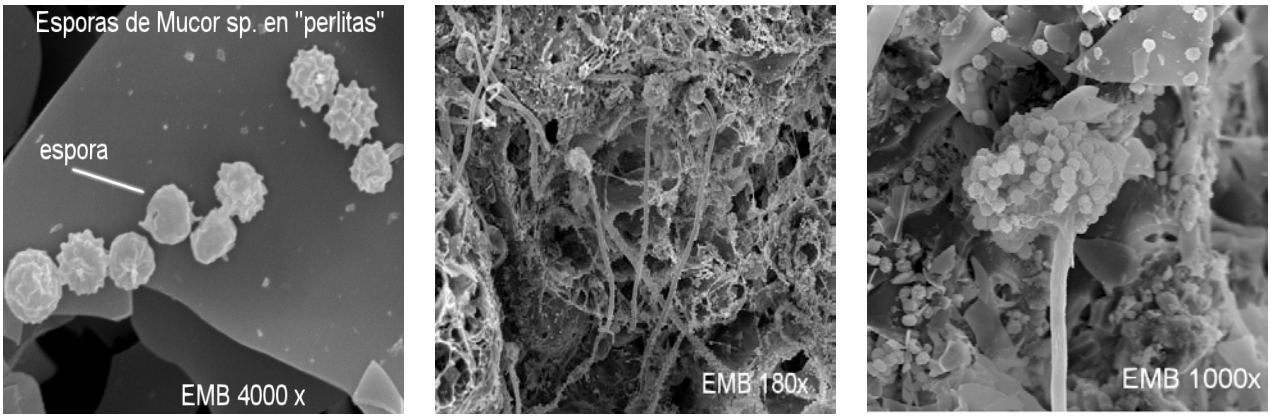
aparezcan de color rojo intenso, debido al viraje del rojo neutro; además, se forma un halo turbio a cierta distancia de estas colonias, fenómeno ocasionado por la precipitación de las sales biliares inducida por la acidez. En cambio, las bacterias Lac^-, al no poder usar la lactosa, recurren como fuente de C a las peptonas, a las que desaminan: incorporan el esqueleto carbonado, excretando iones NH_4^+, que alcalinizan el medio de cultivo, lo cual se traduce en que el indicador rojo neutro vira a amarillo.

Cultivos sobre soporte sólido inerte

Desde hace un tiempo estamos utilizando en la cátedra un soporte poroso inerte las "perlitas" material que tiene la característica de ser barato, fácilmente esterilizable y con una gran capacidad de retención de líquidos en sus oquedades lo cual permite variados cultivos.



Microscopía Electrónica de Barrido (EMB) de levaduras cultivadas sobre "perlitas"



Microscopía Electrónica de Barrido (EMB) de *Mucor sp*. cultivado sobre "perlitas"

ENZIMAS MICROBIANAS

ENZIMAS

Son catalizadores biológicos que participan activamente en los procesos fisiológicos que suceden en los organismos. Son producidas por los microorganismos con una estructura de elevado peso molecular, de naturaleza proteica y especifica para cada sustrato estando determinada por los centros activos formados por grupo de aminoácidos.

COMPOSICION.

Apoenzima parte proteica.

Coenzima: la no proteica la cual puede estar formado a veces por una vitamina o por un metal.

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS

Procesos de catabolismo o desamilación:
Donde se degradan los compuestos y se libera energía que se utiliza en las actividades vitales del organismo.

Proceso de anabolismo o asimilación:
Donde se incorporan nutrientes para la síntesis de los componentes del cuerpo (vitaminas, sustancias de reserva) donde se consume energía

ACCION ENZIMATICA

- Esta influenciada por:
- PH
- Temperatura.
- La temperatura optima de las enzimas para cada microorganismo esta en dependencia en el grado y rango de tolerancia en que se desenvuelve

GLOSARIO.

Adaptación (del latín *adaptare* = acomodar): Tendencia de un organismo a "adecuarse" a su medio ambiente; uno de los principales puntos de la teoría de la evolución por la selección natural de Charles Darwin: los organismos se adaptan a su medio ambiente. Aquellos organismos mejor adaptados tendrán mayor probabilidad de sobrevivir y pasar sus genes a la siguiente generación

Aminoácidos (del griego *Ammon* = dios egipcio cerca de cuyo templo se prepararon por primera vez las sales de amonio a partir de estiércol de camello): Las subunidades (monómeros) que forman las proteínas (polímeros). Cada aminoácido posee por lo menos un grupo funcional amino (básico) y un grupo funcional carboxilo (ácido) y difiere de otros aminoácidos por la composición de su grupo R.

Anabolismo (del griego *ana* = sobre, *metabole* = cambio): en un organismo el conjunto de reacciones biosintéticas o sea las reacciones en que moléculas pequeñas forman moléculas más grandes.

Arqueobacterias (del griego *arkhaios* = antiguo; *bakterion* = bastón: grupo de procariotas de unos 3.500 millones de años de antigüedad, presentan una serie de características diferenciales que hicieron que Carl Woese, profesor de la Universidad de Illinois, Urbana, U.S.A., proponga su separación del reino Moneras y la creación de uno nuevo: Archea, propuesta que hoy es cada vez mas aceptada.

Autótrofos (del griego *autos* = propio; *trophe* = nutrición, que se alimenta de): termino utilizado para nombrar a organismos que sintetizan sus propios nutrientes a partir de materia prima inorgánica. Opuesto a heterótrofo.

ATP (adenosín trifosfato): El principal producto químico utilizado por los sistemas vivientes para almacenar energía, consiste en un una base (adenina) unida a un azúcar (ribosa) y a tres fosfatos.

Catabolismo (del griego *katabole*= derribar) en un organismo, todas las reacciones químicas en las cuales las moléculas grandes se desintegran en partes mas pequeñas.

Catalizador (del griego *katalysis* = disolución): Sustancia que disminuye la energía de activación de una reacción química, acelerando la velocidad de la reacción.

Cianobacterias: o algas verde-azuladas, procariotas con capacidad fotosintética , algunas de ellas asimilan nitrógeno atmosférico. Organismos que se encuentran entre los más antiguos conocidos existiendo depósitos fósiles de cerca de 3.000 millones de años.

Clorofila: (del griego *khloros* = verde claro, verde amarillento; *phylo*s = hoja): Pigmento verde que interviene en la captación de la energía lumínica durante la fotosíntesis.

Coenzima (del griego *co* = juntos): molécula o cofactor no proteico que colabora con la enzima en su función catalítica , con frecuencia actúan en reacciones de oxido-reducción.

Coloide: Suspensión permanente de partículas finas

Cortex 1) La parte externa de un órgano, p.ej. la corteza adrenal de las suprarrenales 2) en plantas la región del tronco o raíz rodeada externamente por la epidermis e internamente por el cilindro central de tejido vascular, formado por tejidos fundamentales, parénquima, colénquima o esclerénquima.

Energía de activación: La menor cantidad de energía requerida para que ocurra una determinada reacción química. Varía de reacción en reacción.

Enzima (del griego *en* = en; *zyme* = levadura): Molécula de proteína que actúa como catalizador en las reacciones bioquímicas.

Energía: la capacidad de producir trabajo

EMB: siglas derivadas del inglés donde MB va por ***M**ethilen **B**lue* (azul de metileno) y la E por eosina.

Eucariotas (del griego *eu* = bueno, verdadero; *karyon* = núcleo, nuez): organismos caracterizados por poseer células con un núcleo verdadero rodeado por membrana. El registro arqueológico muestra su presencia en rocas de aproximadamente 1.200 a 1500 millones de años de antigüedad

Evolución (del latín *e-* = fuera; *volvere* = girar): Cambio de los organismos por adaptación, variación, sobrerreproducción y reproducción/sobrevivencia diferencial, proceso al que Charles Darwin y Alfred Wallace se refirieron como selección natural.

Exoenzimas (del griego *ex* = fuera, *en* = en, *zyme* = levadura): Enzimas que salen fuerade la célula

Fósiles (del latín *fossilis* = enterrado): Los vestigios o restos de vida prehistórica preservadas en las rocas de la corteza Terrestre. Cualquier evidencia de vida pasada.

Fotosíntesis (del griego *photos* = luz; *syn* = juntos; *tithenai* = ubicar): Conversión de energía lumínica en energía química. Síntesis de compuestos orgánicos a partir de anhídrido carbónico y agua utilizando la energía lumínica captada por la clorofila. Tema ampliado

Genes (del griego *genos* = nacimiento, raza; del latín s*genus* = raza, origen): segmentos específicos de ADN que controlan las estructuras y funciones celulares; la unidad funcional de la herencia. Secuencia de bases de ADN que usualmente codifican para una secuencia polipetídica de aminoácidos. Tema ampliado

Glucosa: Azúcar común, con seis átomos de carbono ($C_6H_{12}O_6$), monosacárido más frecuente en la mayoría de los organismos.

Halófilas (del griego *halos* = sal, mar; *philios* = amigo): bacterias que medran en ambientes salinos

Heterótrofos (del griego *hetero*s = otro, diferente; *trophe* = nutrición, que se alimenta de): Organismos que obtienen sus alimentos rompiendo moléculas orgánicas sintetizadas por otros organismos para obtener energía, opuesto a autótrofo. Incluyen a muchas bacterias, hongos y animales.

Hidratos de carbono: Cumplen funciones de almacenamiento energético, estructurales e intervienen en procesos de regulación y de reconocimiento. Compuesto orgánico en el cual por cada átomo de carbono se encuentra hidrógeno y oxígeno en una proporción 2:1, p.ej. el azúcar. .

Hidrocarburo : compuesto orgánico formado solo por carbono e hidrógeno

Lípidos (del griego *lipos* = grasa): Intervienen en el almacenamiento a largo plazo de la energía celular, aislamiento, forman parte de estructuras (p. ej. membranas) y en ciertos casos en funciones de control. Este grupo incluye a las grasas, aceites, los esteroides (p.ej. el colesterol), los fosfolípidos y los carotenoides. Moléculas orgánicas no polares insolubles en agua y soluble en solventes orgánicos (también no polares).

Magnetita: Las magnetitas fósiles se consideran de origen bacteriano. Curiosamente cadenas de magnetitas se encontraron en el meteorito marciano ALH84001 con un patrón semejante al de las bacterias terrestres.

Mesófilo (del griego *mesos* = intermedio): referido a la temperatura de desarrollo bacteriano, entre 20 ^{o}C y 42 ^{o}C. Otros comportamientos en referencia la temperatura son: psicrófilo, por debajo de 20 ^{o}C; termófilo: entre 40 y 70 ^{o}C; termófilos extremos: por encima de los 70 ^{o}C; hipertermófilos: por encima de 80 y 100 ^{o}C.

Metabolismo (del griego *metabole* = cambio): El conjunto de reacciones químicas que se producen en las células vivas

Minerales: Elemento o compuesto inorgánico que ocurre naturalmente

Monómero (del griego *monos* = uno, solo; *meros* = parte): Molécula que constituye la unidad que se repite en un polímero.

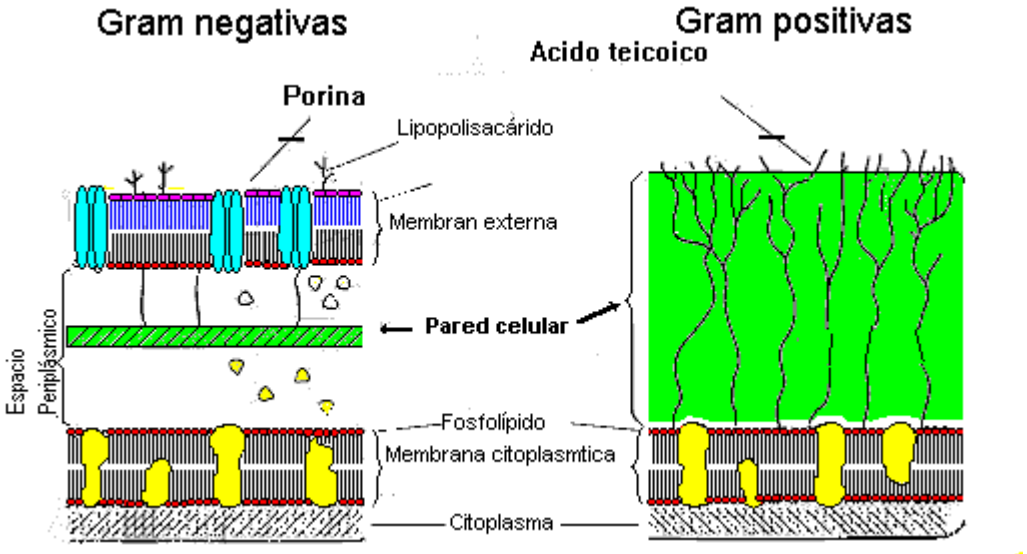
Monosacárido (del griego *monos*= sencillo; del árabe *súkkar* = azúcar): azúcar simple que no puede ser hidrolizado a moléculas de azúcar más pequeñas.

Nutrición (del latín *nutritio*: acción y efecto de nutrir): Nutrir: del latín *nutrire* aumentar la sustancia viva del organismo

Oligotróficos (del griego *oligo* = poco; *trophe* = nutrición, que se alimenta de): literalmente "poco alimento"

Paradigma del griego *paradeigma* : modelo, ejemplo

Periplásmico: En bacterias gram negativas el espacio que va desde membrana plasmática a membrana externa. Aparentemente tiene una consistencia gelatinosa. Contiene abundantes enzimas



Pelo radical: tricoma en la epidermis de la raíz que es una simple extensión de una célula epidérmica .

Polímero (del griego *polys* = muchos, *meros* = parte): Molécula compuesta por muchas subunidades idénticas o similares.

Proteínas: (del griego *proteios* = primario, del griego Proteo, dios mitológico que adoptaba numerosas formas). Polímeros constituidos por aminoácidos que intervienen en numerosas funciones celulares. Una de las clases de macromoléculas orgánicas que tienen funciones estructurales y de control en los sistemas vivientes. Las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos por uniones peptídicas.

Procariota (del latín *pro* = antes, del griego *karyon* = núcleo, nuez): Tipo de célula que carece de núcleo rodeado por membrana, posee un solo cromosoma circular y ribosomas que sedimentan a 70 S (los de los eucariotas lo hacen a 80S). Carecen de organelas rodeadas por membranas. Se consideran las primeras formas de vida sobre la Tierra, existen evidencias que indican que ya existían hace unos 3.500.000.000 años.

Quimiolitoautótrofos (del griego *litho*s = piedra; *autos* = propio; *trophe* = nutrición, que se alimenta de): un ejemplo singular lo constituye una bacteria capaz de oxidar el ácido sulfídrico (SH_2) y transformar el anhídrido carbónico en moléculas orgánicas utilizando la energía química de esta oxidación, vive en simbiósis con un gusano: *Riftia pachyptila* en los medios hidrotermales profundos.

Simbiosis(del griego *syn* = junto, con; *bioonai* = vivir) Asociación entre dos o más organismos de diferentes especies. Incluye 1) mutualismo donde la asociación es beneficiosa para ambos 2) comensalismo donde uno se beneficia y el otro no es dañado ni beneficiado 3) parasitismo uno se beneficia y el otro es dañado.
Teicoicos (del griego *teichos* = muro): cadenas de moléculas de glicerina o ribitol esterificadas entre sí por puentes fosfato, portan una fuerte carga negativa (probablemente sirvan para "secuestrar cationes"). Se unen a la mureína a través del fosfato formando una amida.

Tinción de Gram
La propiedad de teñirse o no de violeta oscuro por la Tinción de Gram es un criterio de clasificación importante correlacionable con otras propiedades bacterianas.

1. El procedimiento se inicia fijando a la llama las bacterias extendidas en un portaobjetos.
2. Las mismas se tiñen con una solución del colorante básico cristal violeta.
3. El paso siguiente consiste en un tratamiento con solución de Lugol (iodo/ioduro de potasio). El yodo forma una laca con el cristal violeta, que es insoluble en agua y soluble en alcohol o acetona
4. El preparado se trata después con alcohol o acetona
5. Finalmente se procede a realizar una coloración de contraste (diferenciación) con otro colorante (fucsina).
6. Como consecuencia de este tratamiento las bacterias que retienen el complejo colorante-yodo durante el paso 4 quedan azules y se denominan Gram positivas.
7. Las células que NO retienen el complejo colorante-yodo durante el paso 4 al tomar el colorante de contraste (paso5) quedan rojas y se denominan Gram negativas

Vitamina (del latín *vita* = vida): Sustancias orgánicas relacionadas que no pueden ser sintetizadas por un organismo en particular y son esenciales, en cantidades pequeñas, para su funcionamiento y crecimiento.

Xerófilas (del griego *xerox* = seco; *phyton* = planta): plantas adaptadas a ambientes secos, por extensión, bacterias adaptadas a actividades de agua baja.

CUESTIONARIO

1. El extracto de carne utilizado en los medios de cultivo es

a. ☐ de composición química definida
b. ☐ no esterizable
c. ☐ un medio del cual se desconoce exactamente su composicón química

2. El agar-agar usado como solidificante en los medios de cultivo funde a cerca de:

a. ☐ 25 grados centígrados
b. ◉ 100 grados centígrados
c. ☐ 50 grados centígrados
d. ☐ 75 grados centígrados

3. La mayoría de los microorganismos desarrolla alrededor de un pH

a. ☐ 2
b. ☐ 7
c. ☐ 11

4. Las bacterias acidófilas tipo *Sulfolobus* desarrollan a pH

a. ☐ 5
b. ☐ 2
c. ☐ 7
d. ☐ 9

5. La bacterias acido-tolerantes tipo *Lactobacillus* desarrollan a un pH

a. ☐ 5
b. ☐ 2
c. ☐ 7
d. ☐ 9

6.- Los medios selectivos permiten el desarrollo de

a. ☐ diferentes tipos de microorganismos
b. ☐ un tipo o unos pocos tipos de microorganismos
c. ☐ organismos tipificados

7. La capacidad de hemólisis de ciertas bacterias puede detectarse utilizando

a. EMB
b. MacConkey
c. Agar-Agar
d. Agar sangre

8. Los medios diferenciales

a. permiten distinguir a simple vista dos o más tipos de bacterias
b. impiden la caracterización de los microorganismos
c. inhiben todo tipo de crecimiento bacteriano

9.-Las enterobacterias estan evolutivamente adaptadas a

a. resistir el frío
b. a soportar sales biliares en su hábitat natural
c. soportar temperaturas superiores a 70 grados centígrados

10. En el agar MacConkey las bacterias fermentadoras de lactosa se ven

a. con un halo rojo resultante del viraje del rojo neutro producidos por los ácidos provenientes de la fermentación de la lactosa
b. con un halo amarillo resultante del viraje del rojo neutro producidos por las base nitrogenadas provenientes de la fermentación de la lactosa
c. con un halo amarillo resultante del viraje del rojo neutro producidos por los ácidos provenientes de la fermentación de la lactosa

11.- Los así denominados "factores de crecimientos" son

a. productos fácilmente sintetizados por las bacterias
b. productos que no sintetizan las bacterias y que deben ser incorporados al medio de cultivo
c. productos que no tiene intervención en el desarrollo de las bacterias

BIBLIOGRAFIA.

- **ENLACE BIOTECNOLOGIA EN LA DISOLUCION Y RECUPERACION DE METALES** http://www.mobot.org/jwcross/phytoremediation/Biotecnologia.htm
- **IDENTIFICACION DE UNA CEPA BACTERIANA** http://bilbo.edu.uy/~microbio/identificacion.html
- **FIJACIÓN DEL NITRÓGENO POR MICROORGANISMOS LIBRES** http://scriptusnaturae.8m.com/Articulos/FijN/libre.html
- **Microorganismos Fijadores de Nitrógeno: Familia Rhizobiaceae** http://www.microbiologia.com.ar/suelo/rhizobium.html
- **Larga vida al salmón** http://www.chilemed.cl/biotecno/reportaje-salmones.htm
- **http://www.biologia.edu.ar/bacterias/nutric~2.htm#oligotrofico**

CAPITULO 6

RESPIRACION AEROBIA Y ANAEROBIA

RESPIRACION AEROBIA

La respiración aerobia, consiste en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente y tiene como propósito la producción de energía biológicamente útil en células que viven en presencia de oxígeno. En este proceso, se transfieren electrones desde la glucosa hasta el oxígeno molecular para producir energía, bióxido de carbono y agua.

Glucosa + 6O2 6CO2 + 6H2O + 36 ATP

En los organismos eucariotas la respiración aerobia sucede en las mitocondrias, mientras que en los organismos procariotas, este tipo de respiración se efectúa en el citosol y en la membrana citoplasmática.

ETAPAS O FASES DE LA RESPIRACIÓN AEROBIA

En presencia de oxígeno, el ácido pirúvico obtenido durante la respiración anaerobia o glucólisis, es oxidado para proporcionar energía, bióxido de carbono y agua. A esta serie de reacciones se le conoce con el nombre de **respiración aerobia** y se divide en tres etapas:

Glucólisis .
Ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico.
Cadena terminal respiratoria o mecanismo de citocromos

GLUCÓLISIS

El proceso de **glucólisis**, visto con anterioridad, se caracteriza por la degradación de la glucosa hasta dos moléculas de ácido pirúvico, en el proceso se producen 2 moléculas de ATP netos y se liberan dos pares de hidrógenos, mismos que pueden ser transportados por el NAD^+ hasta la cadena terminar respiratoria para producir mas ATP.

Glucosa + 2ADP + 2Pi + $2NAD^+$ $\rightleftharpoons$ 2 Ácido Pirúvico + 2**ATP** + 2NADH + H^+

En presencia de oxígeno molecular, las dos moléculas de ácido pirúvico serán oxidadas hasta acetil-CoA, iniciando así la siguiente etapa del proceso respiratorio aerobio.

CICLO DE KREBS

El **ciclo de Krebs** lleva este nombre en honor del bioquímico británico Sir Hans Krebs de la Universidad de Oxford, quien en 1953 compartió el premio Nobel con otros investigadores por su contribución al conocimiento de este proceso metabólico. Al ciclo de Krebs también se le conoce con los nombres de:

Ciclo del ácido cítrico, ya que este compuesto es uno de los metabolitos intermedios dentro del proceso.

Ciclo de los ácidos tricarboxílicos, debido a que en el proceso se forman cuatro metabolitos intermedios que presentan tres grupos carboxilos en su estructura.

Los eventos que marcan el inicio del ciclo de Krebs son la **oxidación del ácido pirúvico**, que ocurre en el exterior de la mitocondria, y la **oxidación de la acetil Co-A** que se efectúa en la matriz mitocondrial (Fig. 1).

Oxidación del ácido pirúvico:

Para continuar el proceso aerobio, el ácido pirúvico debe ser transportado al interior de la mitocondria con ayuda de un transportador especial. Ya en el interior, las dos moléculas de **ácido pirúvico** son oxidadas hasta dos moléculas de **acetil-CoA**, las cuales ingresan al ciclo de Krebs. Un evento importante dentro de esta oxidación es la liberación de dos pares de hidrógenos, estos, al ser transportados a la cadena terminal respiratoria liberarán su energía y producirán moléculas de ATP

Oxidación de la acetil Co-A:

En el ciclo de Krebs, las dos moléculas de acetil Co-A se oxidan a través de una serie de reacciones enzimáticas; como producto de esta oxidación, se producen dos moléculas de ATP y se liberan 8 pares de átomos de hidrógeno. Estos hidrógenos con sus electrones serán transportados hasta la cadena terminal respiratoria donde liberarán su energía y formarán moléculas de ATP; las sustancias encargadas de este transporte son las coenzimas nicotinamida adenina dinucleótido o NAD^+ y la flavín adenina dinucleótido o FAD.

El ciclo de Krebs no se caracteriza por una alta producción de ATP, ya que en el solamente se forman **dos moléculas de ATP**. La importancia está en la **liberación y transportación de hidrógenos y electrones** hacia la cadena terminal respiratoria; aquí, los transportadores se oxidarán y darán lugar a la generación de ATP.

REACCIONES DEL CICLO DE KREBS:

A continuación, se presenta las totalidad de reacciones enzimáticas que caracterizan al ciclo de Krebs, estas tienen como sustrato al ácido pirúvico, el cual se oxida hasta acetil Co-A.

1.- El **ácido pirúvico** es oxidado para formar un derivado activo del ácido acético, la **acetil Co-A**, además se produce bióxido de carbono y se liberan 2 pares de hidrógenos, que son capturados por la coenzima NAD^+.

2.- La **acetil Co-A** se condensa con el ácido oxaloacético para formar **ácido cítrico** y libera a la coenzima A. Esta reacción es catalizada por una enzima condensadora llamada citrato sintasa que cataliza la formación del enlace carbono - carbono entre el carbono metílico de la acetil Co-A y el carbono carbonilo del ácido oxaloacético.

3.- El **ácido cítrico** se transforma en **ácido isocítrico** vía cis-aconítico. Esta conversión tiene lugar en dos etapas: en la primera el ácido cítrico se deshidrata a cis-aconitato; en la segunda, el cis-aconitato se rehidrata a ácido isocítrico. La reacción es catalizada por la enzima aconitasa (aconitato hidratasa).

4.- El **ácido isocítrico** se transforma en **ácido α-cetoglutárico** vía oxalosuccínico. También ocurre en dos etapas: en la primera de ellas, cada molécula de ácido isocítrico libera un par de hidrógenos (ver fórmula anterior) y se forma el ácido oxalosuccínico; en la segunda, el ácido oxalosuccínico sufre una descarboxilación y se transforma en ácido α-cetoglutárico. Los hidrógenos son atrapados por el NAD^+ , quien los transportará a la cadena terminal respiratoria. La reacción es catalizada por la enzima isocítrico deshidrogenada

5.- En la siguiente reacción, el **ácido α-cetoglutárico** se transforma hasta **ácido succínico** debido a una descarboxilación oxidativa similar a la que sufrió el ácido pirúvico cuando se inició el ciclo.

a) En una primera etapa, cada ácido α-cetoglutárico se transforma en succinil CoA por descarboxilación y pérdida un par de hidrógenos. Todo esto es catalizado por un complejo enzimático denominado α-cetoglutarato deshidrogenasa, además de la participación de la Coenzima A.

b) La succinil CoA formada se transforma en ácido succínico y produce ATP; la reacción es catalizada por la enzima succinato tioquinasa y la participación de ADP y fósforo inorgánico. El ATP se deriva del enlace de alta energía que se formó entre el ácido succínico y la Co-A.

6.- En el siguiente paso, el **ácido succínico** se oxida hasta **ácido fumárico** liberando un par de hidrógenos por molécula de ácido succínico oxidada, los cuales son atrapados por el transportador flavín adenina dinucleótido o FAD. Esta reacción es catalizada por la enzima ácido succínico deshidrogenasa.

7.- Posteriormente el **ácido fumárico** sufre una adición enzimática de agua para transformarse en **ácido málico**; la reacción es catalizada por la enzima fumarasa. Finalmente, el ácido fumárico es oxidado hasta **ácido oxaloacético**, los hidrógenos liberados en este paso son transferidos al transportador NAD^+.

CONCLUSIONES PARA EL CICLO DE KREBS

A. El sustrato representativo del ciclo de Krebs son las dos moléculas de **ácido pirúvico** que resultan de la glucólisis; estos, son transformados hasta **Acetil CoA**.

B. La Acetil CoA y sus residuos (residuos acetilos) son catabolizados durante el ciclo de Krebs, formando dos moléculas de ATP y equivalentes de hidrógeno en forma de NADH + H^+ y $FADH_2$.

C. El ATP se forma directamente durante la descarboxilación oxidativa del ácido α-cetoglutárico hasta ácido succínico; en total se forman **2 moleculas de ATP**

D. Por cada molécula de ácido pirúvico que entra al ciclo de Krebs, se obtienen **4 NADH + H^+** y **1 $FADH_2$**; como son dos las moléculas que entran al ciclo, se producen un total de **8 NADH + H^+** y **2 $FADH_2$** los cuales al ser transferidos a la cadena terminal respiratoria serán clave para la producción de energía

E. La oxidación del ácido málico origina nuevamente al ácido oxaloacético, esta regeneración permite que sea utilizado una y otra vez para la degradación subsecuente de otras moléculas de acetil CoA

CADENA TERMINAL RESPIRATORIA O MECANISMO DE CITOCROMOS

Los átomos de carbono de la molécula de glucosa se han oxidado completamente, parte de la energía potencial de la glucosa se ha utilizado para producir 4 moléculas de ATP a partir de ADP; dos de estas moléculas se formaron durante la glucólisis y las otras dos en el ciclo de Krebs. Sin embargo, la mayor parte de la energía potencial de la glucosa permanece en los hidrógenos y electrones que forman parte de la estructura del NADH + H^+ y el $FADH_2$ (Tabla 1).

ETAPA DE LA RESPIRACIÓN	TRANSPORTADORES DE ELECTRONES	
	NADH + H^+	$FADH_2$
Glucólisis	**2**	**0**
Oxidación del ácido pirúvico hasta acetil-CoA	**2**	**0**
Ciclo de Krebs	**6**	**2**
Total	**10**	**2**

Tabla 1: Hidrógenos y electrones transferidos durante el proceso de respiración aerobia

Clasificación de los microorganismos aerobios

Aerobios obligados o estrictos:
Poseen endoenzimas para el traspaso del hidrogeno al oxigeno atmosférico como aceptor, se desarrollan en presencia de 20% de oxigeno atmosférico, poseen las enzimas catalasas.

Microaerofilos:
Toleran concentraciones menores de oxigeno atmosférico hasta el 17% para su crecimiento y desarrollo

RESPIRACION ANAEROBIA

Una de las series de reacciones a través de la cual se degrada la glucosa, es la **respiración anaerobia**, conocida también con los nombres de **glucólisis** y **fermentación**. El primer término,

generalmente se emplea para referirse a la respiración anaerobia en los animales, mientras que el segundo es aplicado al proceso respiratorio en bacterias que viven en ausencia de oxígeno.

Para algunos organismos, como cierto tipo de bacterias, la respiración anaerobia es el único proceso que les permite obtener energía biológicamente útil. Para otros, incluyendo al hombre, el proceso anaerobio es una de las etapas de su metabolismo energético.

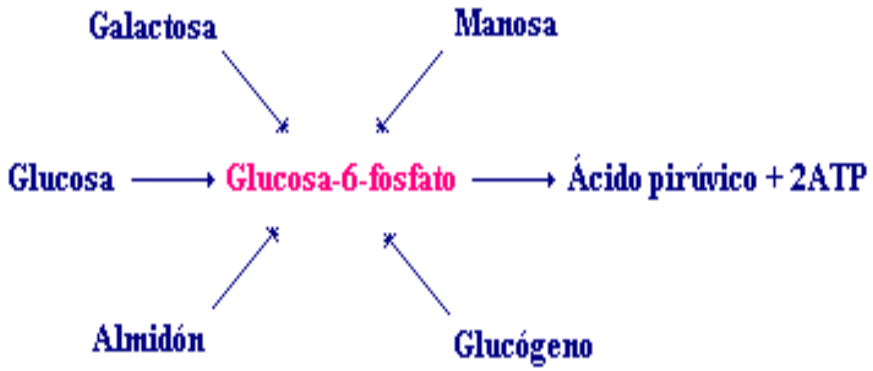
FINALIDAD DE LA GLUCÓLISIS

La **glucólisis** (***glycos*** = azúcar, ***lisis*** = disolución, destrucción) es el proceso químico mediante el cual una molécula de glucosa se transforma en dos moléculas de ácido pirúvico y se producen dos moléculas de ATP netos. Las reacciones químicas de la glucólisis se efectúan en el citosol celular.

La reacción general de este proceso es la siguiente:

$$\text{glucosa} + 2\text{Pi} + 2\text{ADP} + 2\text{NAD}^{+} \rightarrow 2 \text{ Ácidos pirúvicos} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^{+}$$

En realidad, durante la glucólisis no se degrada glucosa pura, sino un derivado fosforilado de la misma llamado **glucosa 6-fosfato**. Este es el paso clave para que otros azúcares entren al proceso de glucólisis, siempre y cuando se fosforilen previamente (Fig. 1).



FERMENTACIONES

El ácido pirúvico bajo condiciones de anaerobiosis puede ser convertido en ácido láctico o en etanol, procesos conocidos como **fermentación láctica** y **fermentación alcohólica** respectivamente.

Los ***lactobacillus***, son bacterias que utilizan la **fermentación láctica** para obtener energía; estos organismos transforman la lactosa de la leche en glucosa y posteriormente en ácido láctico. Este proceso tiene importancia industrial ya que se utiliza en la fabricación de yogurt.

Este tipo de respiración anaerobia, **también ocurre en tejidos animales que funcionan bajo condiciones limitadas de oxígeno**, como el **músculo esquelético**, **músculo liso**, **médula renal**, **vías gastrointestinales**, **retina** y **piel**. Un ejemplo de acumulación de ácido láctico en tejidos

humanos, lo podemos apreciar después de un ejercicio intenso, sobre todo cuando se trata de "deportistas de fin de semana"; el ácido láctico se acumula en las células musculares provocando dolor, el cual va desapareciendo poco a poco, conforme el ácido láctico pasa a la circulación sanguínea y llega al hígado donde se transforma nuevamente en ácido pirúvico.

Durante la **fermentación alcohólica**, que realizan las levaduras, el ácido pirúvico es descarboxilado y se transforma en acetaldehído el cual, posteriormente, se reduce a etanol

La fermentación alcohólica también tiene importancia comercial ya que se utiliza en la fabricación de cerveza, vino y levadura de panificación. Para ello, se utiliza una bacteria anaerobia facultativa llamada ***saccharomyces cerevisiae***. Es facultativa porque bajo condiciones anaerobias lleva a cabo la fermentación alcohólica; en presencia de oxígeno, continúa con el proceso aerobio.

Para la levadura como organismo, el producto básico de la fermentación es la producción de ATP, mientras que el etanol y el bióxido de carbono son productos de desecho. En los procesos industriales donde interviene la levadura, el producto principal varía, por ejemplo, en la producción de alcohol, el producto principal es el etanol, mientras que para la elaboración de pan el producto fundamental es el bióxido de carbono.

Clasificación de los microorganismo anaerobios

Anaerobios facultativos:
Pueden vivir y reproducirse en presencia y en ausencia de oxigeno, teniendo la facilidad de modificar su sistema enzimático según las condiciones ambientales, lo integran la mayoría de los microorganismo patógenos y saprofitos.

Anaerobios estrictos u obligados.
La presencia de oxigeno le impide su crecimiento, siendo sustancias orgánicas o elementos inorgánicos los aceptores del ion hidrogeno. No poseen la enzima catalasa

CAPITULO 7

ECOLOGIA MICROBIANA

Debido a su pequeño tamaño y a su estilo de vida individual, las células procarióticas sufren los cambios ambientales de un modo mucho más directo e inmediato que las células de los organismos pluricelulares. A lo largo de miles de millones de años, los procariotas han venido estando sometidas a diversas presiones ambientales, y han respondido evolutivamente creando numerosos mecanismos de adaptación. Actualmente, las únicas formas de vida existentes en determinados ambientes extremos son exclusivamente procarióticas. Desafiando a nuestras ideas preconcebidas de lo que es la vida "normal", encontramos extraordinarios seres vivos unicelulares viviendo "cómodamente" a pHs muy ácidos o muy alcalinos, medrando en salmueras y salinas, o reproduciéndose a temperaturas de más de 100ºC y a grandes presiones. Este tipo de microorganismos que habitan medios que los humanos consideramos como "extremos" reciben el calificativo de **extremófilos**. En este capítulo veremos algunas de estas notables adaptaciones.

Hasta ahora hemos venido considerando el crecimiento de las bacterias en función de su fondo genético, en relación con los nutrientes, y en unas hipotéticas condiciones ideales (óptimas). Sin embargo, el trabajo experimental con microorganismos ha de tener en cuenta los **factores ambientales**, es decir, una serie de agentes físicos y químicos que

1) modifican la velocidad de crecimiento, provocando cambios que, a determinados valores de dichos factores pueden llegar a ocasionar la muerte de microorganismos;

2) condicionan la distribuición de los microorganismos en sus ecosistemas y hábitats naturales;

3) permiten a los humanos controlar el crecimiento microbiano, por medio de la fijación de parámetros para:
   a) la mutagénesis,
   b) la esterilización y desinfección,
   c) la quimioterapia.

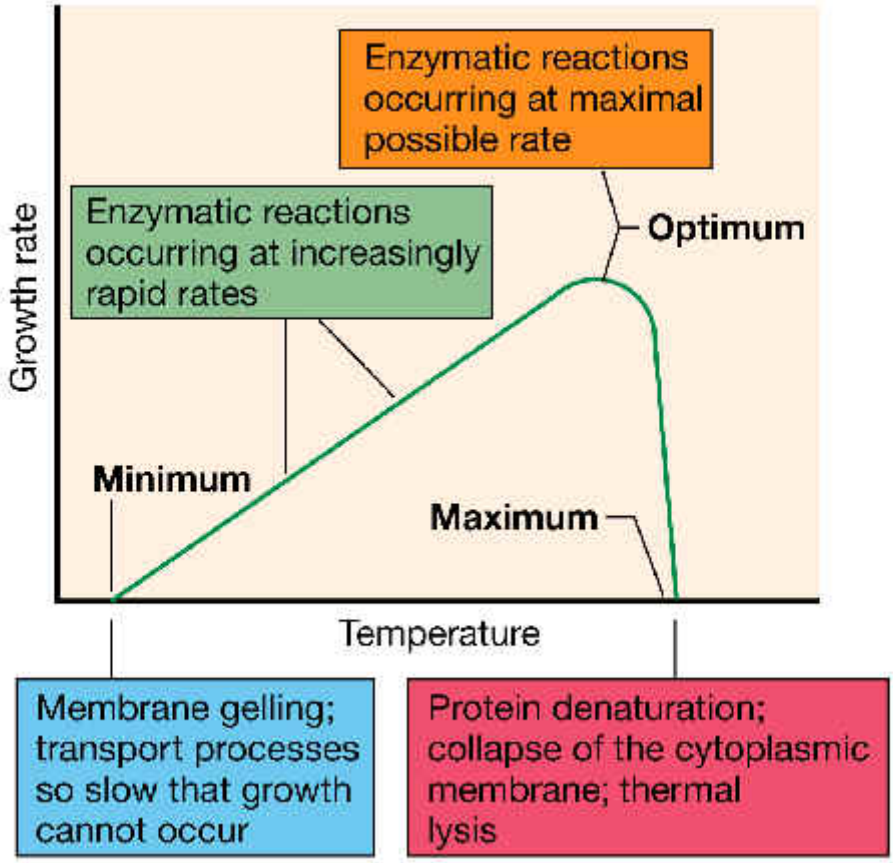
No todos los microorganismos toleran del mismo modo un determinado factor ambiental. Así, unas determinadas condiciones pueden ser nocivas para una especie bacteriana, y en cambio ser neutras o beneficiosas para otra

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO

La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos.

La temperatura afecta a la velocidad de crecimiento (y, por lo tanto al tiempo de generación, **g**).

Cada bacteria (y suponiendo que el resto de condiciones ambientales se mantienten constantes) muestra una **curva característica** de tasa de crecimiento en función de la temperatura, donde podemos distinguir tres puntos característicos llamados **temperaturas cardinales**:



- Temperatura mínima: por debajo de ella no hay crecimiento;
- Temperatura máxima: por encima de ella tampoco existe crecimiento;
- Temperatura óptima: permite la máxima tasa de crecimiento (o sea, **g** mínimo).

El margen entre la temperatura mínima y la máxima se suele llamar margen de crecimiento, y en muchas bacterias suele comprender unos 40 grados.

La **temperatura mínima** se puede explicar en función de un descenso de la fluidez de la membrana, de modo que se **detienen los procesos de transporte** de nutrientes y **el gradiente de protones**.

Por encima de la temperatura mínima la tasa de crecimiento va aumentando proporcionalmente hasta alcanzar la **temperatura óptima**, debido a que las reacciones metabólicas catalizadas por enzimas se van aproximando a su óptimo. En dicha temperatura óptima las enzimas y reacciones se dan a su máxima tasa posible.

A partir de la temperatura óptima, si seguimos subiendo la temperatura se produce un descenso acusado de la tasa de crecimiento hasta alcanzar la **temperatura máxima**. Dicha temperatura

refleja **desnaturalización e inactivación de proteínas** enzimáticas esenciales, **colapsamiento de la membrana** citoplásmica y a veces lisis térmica de la bacteria.

Obsérvese en el gráfico que la temperatura óptima está más cerca de la máxima que de la mínima.

CLASES DE MICROORGANISMOS SEGÚN LA TEMPERATURA: ADAPTACIONES EVOLUTIVAS

Cada especie o cepa bacteriana tiene temperaturas cardinales distintas, de modo que una bacteria puede presentar una temperatura óptima superior a la temperatura máxima de otra, o inferior a la temperatura mínima de una tercera. Según el rango de temperaturas al que pueden crecer las distintas bacterias, se pueden establecer tres tipos principales:

MICROORGANISMOS PSICRÓFILOS

Las **psicrófilas o criófilas**: crecen a partir de entre -5 a 5ºC.

a) Las llamadas psicrófilas obligadas tienen temperatura óptima a 15-18ºC, como por ejemplo *Flavobacterium*. La bacteria *Polaromonas vacuolata*, recientemente aislada en aguas heladas de la Antártida es lo que pudiéramos llamar un psicrófilo extremo: tiene su óptimo de crecimiento en 4ºC, y es incapaz de crecer a 14ºC (¡se muere de calor!).
b) Las psicrófilas facultativas o psicrotolerantes (también llamadas psicrotrofas) presentan temperatura óptima en torno a los 20-30ºC y máximas a los 35ºC. Las bacterias y hongos psicrotrofos son los responsables de que los alimentos guardados en nevera se estropeen al cabo del tiempo.

Ejemplos de medios **permanentemente fríos** son la mayor parte de las aguas oceánicas (cuya temperatura media es de unos 5^{o}C, pero que en las profundidades alcanzan sólo 1-2ºC por encima de cero) y las áreas permanentemente heladas del Ártico y de la Antártida. En los medios helados existen pequeñas bolsas o microcavidades de agua líquida, donde pueden medrar algunos microorganismos. Un ejemplo no bacteriano muy característico es el alga de las nieves *(Chlamydomonas nivalis)*, que llega a conferir color rojo a la nieve en algunas zonas de montaña a mitad de la estación estival.

Las principales **adaptaciones bioquímicas a medios fríos** exhibidas por estos microorganismos psicrófilos son:

- enzimas más resistentes al frío;
- sistemas de transporte adaptados a bajas temperaturas;
- los fosfolípidos de la membrana celular aumentan la proporción de ácidos grasos insaturados (y en algunas bacterias, poliinsaturados, con entre 4 y 9 dobles enlaces); ello supone que la membrana sigue en su estado semifluido, evitándose su congelación.

Los psicrotrofos (psicrófilos facultativos) son más abundantes, ya que están adaptados a soportar grandes oscilaciones térmicas, y en verano pueden crecer a unos 30ºC-40ºC. Algunas bacterias y hongos pueden crecer en alimentos (carne, leche, frutas y hortalizas) que se guardan en frigoríficos, alterando las cualidades organolépticas e incluso, echándolos a perder (una experiencia que casi todos hemos tenido).

MICROORGANISMOS MESÓFILOS

Los **mesófilos** presentan temperaturas óptimas a los 25-40ºC y máximas entre 35 y 47ºC. La mayor parte de las eubacterias (incluyendo las patógenas) pertenecen a esta categoría. La mayor parte de los microorganismos que viven en ambientes templados y tropicales, incluyendo los simbiontes y parásitos, pertenecen a esta categoría.

MICROORGANISMOS TERMÓFILOS

Las únicas formas de vida capaces de vivir por encima de 65ºC son todas procariotas. Los **termófilos** presentan óptimos a 50-75ºC y máximos entre 80 y 113ºC. Dentro de esta categoría se suele distinguir las termófilas extremas (=hipertermófilas), que pueden llegar a presentar óptimos cercanos a los 100ºC, y que taxonómicamente pertenecen al dominio de las *Archaea*.

Los hábitats naturales con **temperaturas permanentemente altas** (por encima de 45-50ºC) están restringidos a unas pocas zonas de la biosfera, normalmente relacionadas con fenómenos volcánicos:

- fuentes termales volcánicas terrestres (en zonas de EE. UU., Japón, Nueva Zelanda e Islandia);
- fuentes termales submarinas: los llamados "humeros" (fumarolas hidrotermales) asociados a las grandes dorsales oceánicas);
- fumarolas
- Los materiales en fermentación como acúmulos de abono (compost) y ensilados pueden alcanzar 65ºC.

Como ejemplo "clásico", muy conocido por documentales de divulgación, recordemos que en el famoso Parque Nacional de Yellowstone, en EE UU, existe la mayor concentración mundial de fuentes volcánicas, con géiseres que emiten a más de 100^{o}C, siendo esta temperatura bastante constante, con oscilaciones de +/- 1 ó 2^{o}C. Cuando esta agua sale, lo hace a punto de ebullición. El riachuelo que genera va bajando su temperatura en su recorrido, de modo que se genera un gradiente de temperatura en el que se pueden estudiar fascinantes comunidades microbianas adaptadas a esas diversas temperaturas. Allí fue donde T.D. Brock descubrió la eubacteria termófila *Thermus aquaticus*, de la que se extrae la ADN polimerasa termorresistente (Taq) empleada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) automatizada. Recientemente se está recurriendo a usar la polimerasa de una arquea hipertermófila, *Pyrococcus furiosus*, que funciona muy bien a 100ºC.

- Los hipertermófilos, con óptimos por encima de los 80ºC son de hecho incapaces de crecer a menos de 37^{o}C, como las citadas arqueas (ej., *Thermoproteus, Pyrococcus, Pyrodictium*).
- La arquea *Pyrolobus fumarii*, habitante de los humeros termales submarinos tiene su óptimo nada menos que a 105ºC y puede llegar a aguantar 113ºC, y parece que detiene su metabolismo (por "frío") a la "agradable" temperatura de 90ºC (!).

- Las termófilas facultativas pueden crecer a menos de 37ºC, como p. ej. la eubacteria *Thermus aquaticus*.

Se han aislado bacterias termófilas en medios artificiales, como calentadores de agua domésticos e industriales.

Las principales **adaptaciones bioquímicas a altas temperaturas** en células vegetativas bacterianas son:

- enzimas termorresistentes. Algunas de ellas tienen un interior molecular muy hidrófobo;
- ribosomas termorresistentes;
- membranas ricas en ácidos grasos saturados, que permiten enlaces hidrofóbicos más fuertes.

En Arqueas hipertermófilas los lípidos son muy especiales: en vez de basarse en ésteres de ácidos grasos con el glicerol, se trata de **éteres** de hidrocarburos unidos al glicerol (el enlace éter es más resistente). Algunas, además, en vez de la típica bicapa lípídica, exhiben una **monocapa bioquímica** de C_{40}-bifitanil-tetraéteres (resultado de unirse "cola con cola" dos C_{20}-fitanil-diéteres), que condicionan una extrema resistencia a agentes ambientales

EFECTO LETAL DEL CALOR

Al subir la temperatura por encima de la temperatura máxima de crecimiento, se dejan sentir los efectos sobre la viabilidad: la pérdida de viabilidad significa que las bacterias dejan de ser capaces de crecer y dividirse, aun cuando las transfiramos a un medio idóneo

Cómo podemos caracterizar o medir en la práctica la inactivación por calor de una suspensión bacteriana? He aquí algunos parámetros utilizados:

- **tiempo térmico mortal**: es el tiempo mínimo requerido para que mueran todas las bacterias de una determinada suspensión a una determinada temperatura;
- **tiempo de reducción decimal**: es el tiempo requerido para reducir al 10% la densidad de la suspensión, a una determinada temperatura (también llamado valor D);
- **punto térmico mortal**: es la temperatura mínima que mata a todas las bacterias en un tiempo determinado (normalmente el tiempo de referencia empleado es de 10 min).

Ejemplos

punto térmico mortal	Especies
55°C	*Escherichia coli*
60°C	*Mycobacterium tuberculosis*
120°C	endosporas de especies muy resistentes de *Bacillus*.

Estos tres parámetros se emplean frecuentemente en industrias alimentarias, como en las de fabricación de conservas, centrales lecheras, etc.

Antes de seguir adelante, es importante tener claro que, dependiendo de la temperatura y el tiempo a que sometamos un material a tratamiento térmico, lograremos **inactivación parcial** de la población microbiana (es decir, queda una fracción de células viables) o bien **esterilización (=inactivación total)**.

En general, entendemos por **esterilización** todo tratamiento de un material con un agente físico (como el calor, que nos ocupa en este momento) o químico (como veremos en el capítulo 14) que acarrea la eliminación de toda forma de vida en él. Una vez estéril, el material sigue estéril indefinidamente con tal de que esté encerrado en un compartimento estanco, sellado y libre del contacto con microorganismos del ambiente exterior.

Centrándonos de nuevo en el calor, la inactivación parcial o la esterilización se pueden lograr por calor húmedo o por calor seco.

La inactivación (total o parcial) por calor se debe a la desnaturalización de proteínas y a la fusión de lípidos de membrana, debido a que se rompen muchos enlaces débiles, sobre todo los puentes de hidrógeno entre grupos -C=O y H_2-N-. Estos enlaces se rompen más fácilmente por calor húmedo (en atmósfera saturada de vapor de agua), debido a que las moléculas de agua pueden desplazar a los puentes de hidrógeno.

CALOR HÚMEDO

Por lo tanto, la inactivación por calor húmedo requiere menores temperaturas que la que se realiza en ausencia de agua. Veamos algunos ejemplos de condiciones de inactivación total por calor húmedo:

Microorganismo	condiciones
La mayoría de células vegetativas, de bacterias, levaduras y hongos	80°C , 5-10 min
Bacilo tuberculoso	58°C , 30 min
Bacilo tuberculoso	59°C , 20 min
Bacilo tuberculoso	65°C , 2 min
Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis	60°C , 60 min
La mayoría de esporas de bacterias patógenas	100°C , pocos min
esporas del patógeno *Clostridium botulinum*	100°C , 5,5 horas
esporas de *Clostridium* y *Bacillus* saprofitos	100°C , muchas horas
esporas de *Clostridium* y *Bacillus* saprofitos	120°C , 15 minutos

Veamos los métodos principales de lograr esterilización de materiales por calor húmedo:

Autoclave (introducido por Chamberland en 1884): Es un aparato que permite calentar muestras por calor húmedo a temperaturas superiores a las de ebullición del agua (sin que ésta hierva), debido a que el tratamiento se efectúa en un compartimento estanco saturado con vapor de agua y a presiones superiores a la atmosférica. (El funcionamiento del autoclave será oportunamente explicado en clases prácticas).

Los parámetros de esterilización suelen ser: temperatura 121ºC y 10-15 min. Como se puede deducir, estos parámetros vienen fijados por la resistencia de las esporas de especies saprofitas (ver última línea de la tabla anterior), que son las formas de vida que más aguantan el calor sin perder viabilidad.

(Hay que tener en cuenta que, en la práctica, a veces hay que emplear condiciones diferentes; por ejemplo: si queremos esterilizar grandes volúmenes de líquido, habrá que prolongar el tratamiento, 30 o 40 min, ya que el centro del recipiente donde va el líquido tarda más en alcanzar la temperatura de esterilización. Los medios de cultivo que incluyen glucosa deben esterilizarse a 115^{o}C, ya que a temperaturas superiores la glucosa "carameliza"; por lo tanto, en estas ocasiones, el tiempo también es mayor: 30 min).

La acción rápida del calor húmedo depende en buena parte del alto valor de calor latente del agua (540 cal·g^{-1}); ello hace que los objetos más fríos (como las muestras a esterilizar) se calienten rápidamente por condensación de agua en su superficie.

Tindalización (nombre en honor de John Tyndall): Es un método de esterilización fraccionada para materiales que se inactivan o estropean a más de 100ºC. Consiste en someter el material a varios ciclos (normalmente 3 ó 4) de dos fases sucesivas cada uno:

a) en la primera fase el material se calienta a una temperatura entre 50 y 100ºC, durante 1 ó 2 horas;
b) en la segunda fase el material se incuba en una estufa, a 30-37ºC durante 24 horas.

Durante las fases de tipo a) mueren todas las células vegetativas de la muestra, pero permanecen viables las esporas, que quedan activadas para germinar. Durante las fases de tipo b) se produce la germinación de las esporas activadas en la respectiva fase anterior. En la siguiente fase de tipo a) morirán las células vegetativas procedentes de la germinación en la fase anterior; y así sucesivamente, hasta que al cabo de unos cuantos ciclos no queda ningun microrganismo en la muestra.

Como se puede ver, este método es bastante engorroso y consumidor de tiempo, por lo que en los últimos años ha sido reemplazado por otro método de esterilización, aunque ya no dependiente del calor: se trata de la esterilización por filtración. Consiste de hacer pasar una solución a través de una membrana o filtro de un tipo de material (normalmente nitrato de celulosa) que presenta poros de un tamaño inferior al de cualquier célula bacteriana (diámetro de poro =0,22 μm).

Aplicaciones principales del calor húmedo:

1. En la práctica cotidiana del laboratorio de microbiología, en la esterilización de medios de cultivo y soluciones.
2. En la esterilización de material quirúrgico.
3. En la esterilización o inactivación parcial, en las industrias alimentarias (conservas, leche y derivados).
   a) En la industria láctea se emplean como métodos de **esterilización** la llamada uperización. La **uperización** o tratamiento UHT consiste en un tratamiento de calor húmedo donde se emplean temperaturas muy altas durante unos pocos segundos (p. ej.: 135-150ºC durante 1-2 seg).
   b) Pero no siempre es imprescindible esterilizar la leche, sino que puede bastar eliminar los posibles microorganismos patógenos que pueden contaminarla, y que son más sensibles al calor que los saprófitos inofensivos. Con esta **inactivación parcial** de la población microbiana de la leche logramos que ésta se conserve durante unos días, sin alterar apenas sus cualidades organolépticas y nutricionales. He aquí los procedimientos más habituales para conseguir esto:

i. La **pasteurización** (en honor a Pasteur, que la introdujo en los años 1860) consiste en tratar la leche a 63ºC durante 30 min, tras los cuales se enfría y envasa rápidamente.
ii. La **pasteurización instantánea** (también conocida por sus siglas en inglés HTST, de *high temperature-short time*) se logra calentando a 72ºC durante sólo 15 segundos, tras de lo cual la muestra se enfría rápidamente. Esta técnica es la más usada actualmente, ya que:
- mata más rápidamente;
- mata mejor organismos más resistentes;
- altera menos el sabor;
- actúa en flujos continuos (y permite procesar grandes volúmenes de leche).

Tras la pasteurización, el número de bacterias viables desciende un 97-99%. Los potenciales patógenos que pueda llevar la leche (*Brucella, Salmonella*, bacilo tuberculoso, *Streptococcus*, etc) son eliminados fácilmente. La pasteurización también se emplea para la preparación de vacunas a base de microorganismos inactivados por el calor.

CALOR SECO

Como ya dijimos, la esterilización por calor seco necesita recurrir a mayores temperaturas que la efectuada por el calor húmedo, ya que al no existir agua, la rotura de puentes de hidrógeno y la desnaturalización de proteínas, así como la fusión de membranas, se efectúan a mayores energías. Otros efectos del calor seco son los daños por oxidación y el provocar un aumento de la concentración de electrolitos.

Aplicaciones del calor seco:

1. El llamado **horno de Pasteur**, mediante calentamiento a 160-170ºC durante 2-3 horas permite esterilizar materiales inertes de laboratorio resistentes al calor: material de vidrio y metálico, aceites y jaleas, etc.
2. **Flameado a la llama** (hasta el rojo) de asas metálicas de siembra, con las que se inoculan las bacterias.
3. **Incineración** de materiales de desecho.

EFECTO DE LAS BAJAS TEMPERATURAS SOBRE LAS BACTERIAS

Las bajas temperaturas (por debajo de la temperatura mínima) no son útiles para la esterilización, ya que, aunque existen algunas bacterias que mueren por congelación (p. ej., especies patógenas de *Neisseria*), el efecto de este tratamiento sobre otras muchas es, sobre todo, bacteriostático, sin contar aquellos organismos psicrófilos o psicrotrofos.

Los efectos de someter una suspensión bacteriana a temperaturas menores de 0ºC dependen de:
- el medio donde están suspendidas las bacterias;
- el modo en que se realice la congelación y una ulterior descongelación.

Cuando la temperatura es ligeramente inferior al punto de congelación del medio, el citoplasma queda **en sobrefusión** (sin congelar) entre -1 y -10ºC. Pero como la tensión de vapor de agua en

el interior es mayor que en el exterior, existe una tendencia a restablecer el equilibrio, que puede ser:

- por pérdida de agua de la célula (cuando la congelación se efectúa lentamente), o bien
- por cristalización de agua en el interior (cuando la congelación se realiza rápidamente).

En ambos casos la consecuencia es que las sales intracelulares se concentran, lo que supone que la solución del citoplasma puede llegar a saturarse, con precipitación de sales. Ello conlleva varias consecuencias: los cristales de sales y la alta concentración de electrolitos provocan la **desnaturalización de proteínas y daños a la membrana**; otro efecto de menor importancia es el **daño mecánico a la pared celular y a la membrana** provocado por los cristales de hielo.

En general, el **enfriamiento rápido es más lesivo que el lento**, existiendo una velocidad óptima. Cuando una bacteria se enfría rápidamente a -35ºC se producen cristales de hielo que provocan daños cuando la muestra se descongela.

Por lo tanto, otro factor a tener en cuenta es la **manera de realizarse la descongelación**, y el **número de ciclos de congelación-descongelación**. La descongelación lenta es más letal que la rápida, ya que aumenta el volumen de cristales de hielo.

Aplicaciones de la congelación:

La congelación se aplica, en laboratorio, **para preservar muestras bacterianas durante largos periodos de tiempo**. Como acabamos de ver, y con objeto de maximizar la viabilidad bacteriana el mayor tiempo posible, es importante cómo se efectúa tanto la congelación como la descongelación. Una vez congeladas, las bacterias supervivientes conservan su viabilidad durante mucho tiempo, siempre que la temperatura se mantenga por debajo del punto eutéctico:

- en nieve carbónica (CO_2 sólido), a -78ºC;
- en nitrógeno líquido, a -180ºC.

Por ello, este método es usado en el laboratorio para guardar cultivos durante largas temporadas. El inconveniente de emplear nieve carbónica o nitrógeno líquido es que hay que reponerlos con relativa frecuencia. Como veremos enseguida, hay métodos menos engorrosos y caros de mantener viables muestras microbianas durante largos periodos de tiempo.

Para preservar aún mejor las bacterias a bajas temperaturas, se recurre a añadir a la suspensión ciertas sustancias, como por ejemplo:

- Sustancias no ionizables de bajo peso molecular que provocan la **solidificación amorfa y vítrea**, en lugar de la cristalización, evitando así la formación de zonas intracelulares con alta concentración de sales: glicerina, sacarosa, lactosa, dimetilsulfóxido (DMSO).
- Materiales ricos en proteína: leche, suero, extracto de carne.
- Proteínas purificadas (p. ej., la albúmina).
- Determinadas macromoléculas: polivinilpirrolidona (PVP), dextranos.

La suspensión bacteriana puede aguantar varios meses congelada con estas sustancia entre -25 a -30ºC, en congelador. Si se hace con nitrógeno líquido, la conservación puede ser de varios años.

LIOFILIZACION

La liofilización es la desecación al vacío de una muestra previamente congelada. Aplicada a bacterias, es uno de los métodos que mantiene por más tiempo la viabilidad bacteriana (varios años). Para obtenerla, el cultivo bacteriano se adiciona de leche o suero (véase epígrafe anterior), se congela sobre nieve carbónica (-78ºC), y se conecta a una bomba de vacío, que provoca la desecación. La eliminación de toda el agua sobre la muestra congelada aumenta la viabilidad de ésta, que se guarda en ampollas cerradas de vidrio a temperatura ambiente, hasta su uso, que como vemos, puede ser incluso muchos años después.

EFECTOS DE LA PRESIÓN OSMÓTICA

Exceptuando los micoplasmas, que carecen de pared celular, las bacterias pueden vivir en medios tanto hipotónicos como hipertónicos, debido a la protección de una pared celular rígida y a la membrana citoplásmica semipermeable.

Normalmente el citoplasma de las bacterias poseen una osmolaridad ligeramente superior a la del entorno, lo que garantiza el paso de agua al interior. La presión de turgor es relativamente constante porque la membrana citoplásmica se topa con la rigidez de la pared celular. Esta presión de turgor permite que la bacteria aguante cambios bruscos de concentración de solutos en su entorno (dentro de ciertos límites). Pero esto plantea una pregunta (que intentaremos responder a continuación): ¿cómo logra la bacteria ajustar su osmolaridad interna a esos cambios exteriores?

A) En medios hipotónicos (con una $a_w > a_w$ del citoplasma) es la pared celular la que ejerce todo el papel: su rigidez se opone a la entrada de agua, y por lo tanto, evita que la membrana citoplásmica tienda a sufrir una presión de turgor excesiva.

B) En medios hipertónicos (cuando la a_w del exterior es menor que la del citoplasma). Las bacterias poseen mecanismos compensatorios por los que tienden a aumentar la osmolaridad interior por encima de la del medio (para garantizar la entrada de agua del ambiente y mantener su metabolismo). Ello se logra esencialmente aumentando la concentración de un soluto muy soluble en agua en el interior celular, soluto llamado genéricamente **soluto compatible**, lo cual se puede lograr por varios posibles mecanismos:

- bombeando iones al interior;
- sintetizando una molécula orgánica osmóticamente activa;
- bombeando sustancias osmoprotectoras.

1) En el caso de los iones, el ión bombeado suele ser el **potasio (K^+)**, por un sistema de antiporte K^+/H^+.

2) Como ejemplos de **síntesis de solutos orgánicos compatibles** y osmóticamente activos tenemos el glutamato, la glutamina y la trehalosa. En levaduras es frecuente que el soluto compatible sea un poliol (sorbitol, manitol, etc.).

Ahora bien, si el medio es muy hipertónico, estos mecanismos ya son incapaces de evitar la salida de agua desde el citosol, lo cual conlleva una retracción de la membrana citoplásmica. La

pérdida de agua puede suponer la deshidratación del citoplasma, lo que conlleva la detención del crecimiento.

- En Gram-positivas se produce una **plasmolisis auténtica** (retracción de la membrana citoplásmica respecto de la pared rígida suprayacente)
- En Gram-negativas no existe auténtica plasmolisis, ya que la pared celular y la membrana citoplásmica se retraen al mismo tiempo. Las bacteria entéricas crecen lentamente por encima de 0.65M de NaCl.

3) Sin embargo, las bacterias pueden crecer a osmolaridades superiores a la máxima teórica, si en el medio existen determinados compuestos llamados osmoprotectores. La bacteria **bombea esos compuestos a su interior**, usándolos como solutos compatibles. Ejemplos de osmoprotectores exógenos que pueden ser bombeados al interior celular:
   - Prolina (p. ej., en *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*)
   - Betaína (glicínbetaína), un derivado trimetilado de la glicocola (en cianobacterias y en algunas Gram-positivas).
   - Colina (en *Escherichia coli*).
   - Ectoína en enterobacterias.

Por ejemplo, *S. typhimurium* crece muy lentamente en 1M de ClNa, pero mejora si al medio se añade 1mM de prolina. Un método normal de aislar *S.aureus* es comprobar el crecimiento en medio con 7.5% de ClNa en presencia de prolina.

Existen ciertos microorganismos especializados que viven en medios hipertónicos, y en general se llaman **osmófilos**. Entre los osmófilos podemos distinguir los sacarófilos y los halófilos.

Uno de los mejores ejemplos de microorganismos **sacarófilos** no es una bacteria, sino las levaduras, que viven en jugos vegetales, néctares, zumos, etc. Utilizan como solutos compatibles polioles como el sorbitol, el ribitol, etc.

Entre los organismos **halófilos**, podemos distinguir los halófilos moderados y los halófilos extremos o hiperhalófilos.

Halófilos moderados: suelen ser bacterias marinas (ej.: *Vibrio fischeri*) que viven en 3.5% de NaCl, y que ven inhibido su crecimiento a concentraciones mayores o menores de sales. Los halófilos moderados tienen requerimientos concretos de una a_w equivalente a la de agua de mar, así como concentraciones determinadas de iones Na^+. El papel jugado por este Na^+ es:

- mantenimiento de los sistemas de membrana citoplásmica y transporte;
- estabilización de la pared celular;
- requerimiento por parte de muchas enzimas.

Halófilos extremos (hiperhalófilos), representados paradigmáticamente por las arqueas del género *Halobacterium*, que viven en (y de hecho *requieren*) concentraciones saturantes de sales (salitrales, lagunas salinas). Usan como soluto compatible el K^+, concentrándolo a partir del medio donde viven, hasta que el citoplasma queda prácticamente saturado con él (4 a 7 M). Esta gran concentración de potasio es esencial para mantener la estabilidad y actividad de sus ribosomas, enzimas y sistemas de transporte. Pero las estructuras superficiales de estas arqueas requieren altas concentraciones de cloruro sódico.

Dejando aparte las bacterias halófilas, hay algunas bacterias **halotolerantes** (como por ejemplo, *Staphylococcus aureus*), pero la inmensa mayoría de los procariotas viven a valores de actividad de agua de 0.98. Por ello, un método que ya se conocía empíricamente en la antigüedad para conservar ciertos alimentos era el desecarlos o salarlos, o añadirles grandes cantidades de azúcar (como en las mermeladas).

FECTO DEL pH

La mayoría de las bacterias pueden crecer dentro de un margen de pH de su medio, manteniendo al mismo tiempo su pH interno óptimo prácticamente constante.

Por ejemplo, *Escherichia coli* puede crecer bien entre pH 6 y pH 8, pero su pH interno es siempre 7.6 o muy cercano a ese valor.

Respecto del margen normal de pH a los que crecen las bacterias, éstas se pueden clasificar en:

- Neutrófilas, si crecen de modo óptimo en torno a la neutralidad (entre pH 5.5 y 8).
- Acidófilas, si crecen normalmente entre pH 0 y pH 5.
- Alcalófilas, si crecen entre pH 8.5 y pH 11.5.

La mayor parte de las bacterias son neutrófilas. Muchas bacterias neutrófilas modifican el pH del medio, y resisten entornos relativamente ácidos o alcalinos. Por ejemplo, algunas bacterias fermentativas excretan ácidos, mientras otras alcalinizan el medio, p. ej., produciendo amonio a partir de desaminación de aminoácidos. Por otro lado, la mayor parte de los hongos y levaduras requieren pHs ligeramente ácidos (en torno a 4-5).

Aunque los microorganismos pueden crecer en un margen más o menos amplio de pH (alrededor de un óptimo), los cambios bruscos pueden ser lesivos (afectando a la membrana y al transporte de solutos, e inhibiendo enzimas). Si el pH citoplásmico cae rápidamente hasta 5 o menos, la bacteria puede morir.

Uno de los mecanismos que, al menos en neutrófilos parece controlar el pH interior es un sistema de antiporte H^+/K^+: a pH ácidos, el interior celular puede quedar en principio más alcalino que el exterior. Este sistema introduce protones en el interior y saca iones potasio. De esta manera neutralizan el pH interior y siguen teniendo un potencial de membrana para establecer una fuerza protón motriz que les suministre energía.

Si el pH interior cae en torno a 6 o 5.5, bacterias como *E. coli* o *S. typhimurium* inducen una respuesta de tolerancia a ácidos, consistente en ATPasas translocadoras de protones (expulsan protones al exterior) y chaperonas (proteínas celadoras) para corregir las proteínas desnaturalizadas.

Existen algunos notables procariotas cuyo pH óptimo es muy bajo (**acidófilos extremos u obligados**): Algunas eubacterias del género *Thiobacillus (T. thiooxidans, T. ferrooxidans)* y las arqueas de los géneros *Sulfolobus, Thermoplasma* y *Ferroplasma* tienen su óptimo a pH 2, y generan ellas mismas estos bajos pH al oxidar sulfuros hasta ácido sulfúrico. (*Sulfolobus* es un Secciones un termoacidófilo). De hecho, estas bacterias necesitan esas altas concentraciones de H^+ para mantener la integridad de sus membranas y envueltas: a pH neutro esas envueltas se

desintegran. Una arquea sorprendentemente acidófila es *Picrophilus oshimae*, cuyo pH óptimo es nada menos que 0.7 (aparte de que es una termófila que necesita temperaturas de más de 60ºC).

Las especies **alcalófilas obligadas** tienen óptimos de pH en torno a 10-11. Por ejemplo, *Bacillus alcalophilus*, cuyo pH interno es de 9. Sus hábitats típicos son suelos carbonatados y lagunas alcalinas (algunos son también halófilos, como *Natronobacterim gregoryi*). Estos organsimos tienen gran interés industrial, porque de ellos se obtienen enzimas hidrolíticas como proteasas y lipasas que se usan como aditivos en detergentes.

CAPITULO 8

ACCIÓN DE LOS AGENTES QUÍMICOS SOBRE LOS MICROORGANISMOS

CONCEPTOS GENERALES

Existen ciertas sustancias químicas que influyen negativamente sobre las bacterias, pudiendo ejercer dos tipos de efectos diferentes:

- bacteriostáticos: cuando impiden el crecimiento bacteriano;
- bactericidas: cuando destruyen (matan) las bacterias.

En general, si no sólo nos referimos a las bacterias, sino a cualquier tipo de microorganismos, hablamos respectivamente de agentes **microbiostáticos** y **microbicidas**. Ahora bien, para una misma sustancia química, la línea de demarcación entre un efecto microbiostático y otro microbicida depende muchas veces de la concentración de dicha sustancia y del tiempo durante el que actúa.

¿Cómo podemos saber que un microorganismo está "muerto"? El único criterio válido es la pérdida irreversible de la capacidad de división celular, es decir, de la **pérdida de viabilidad**, y se suele comprobar empleando técnicas con placas de Petri (es decir, confirmando que no crecen en medios sólidos adecuados).

Antes de proceder al estudio de las diversas moléculas que pueden afectar el crecimiento o la viabilidad de los microorganismos, veamos unas cuantas definiciones básicas.

- **Agentes esterilizantes** son aquellos que producen la inactivación total de todas las formas de vida microbiana (o sea, su "muerte" o pérdida irreversible de su viabilidad). (También existen agentes físicos esterilizantes, como ya vimos en los dos capítulos anteriores).
- **Agentes desinfectantes (o germicidas)** son agentes (sobre todo químicos) antimicrobianos capaces de matar los microorganismos patógenos (infecciosos) de un material. Pueden (y en muchos casos suelen) presentar efectos tóxicos sobre tejidos vivos, por lo que se suelen emplear sólo sobre materiales inertes.
- **Agentes antisépticos** son sustancias químicas antimicrobianas que se oponen a la sepsis o putrefacción de materiales vivos. Se trata de desinfectantes con baja actividad tóxica hacia los tejidos vivos donde se aplican.
- **Quimioterápicos** son compuestos químicos con actividad microbicida o microbiostática, con una toxicidad suficientemente baja como para permitir su administración a un organismo superior, en cuyos fluidos corporales y tejidos permanece estable un cierto tiempo a concentraciones tales que los hace eficaces como antimicrobianos dentro del organismo.

Todos los días usamos agentes químicos para controlar el crecimiento microbiano: detergentes y jabones para el cuerpo y la ropa, cloración de las aguas potables, antisépticos para la piel y el tratamiento de heridas, desinfectantes para tratar superficies en la industria y en los laboratorios, quimioterápicos y antibióticos para tratar enfermedades bacterianas, etc.

DESINFECTANTES Y ANTISÉPTICOS

Como se recordará cuando tratamos el tema del calor como agentes esterilizante, la muerte de una población bacteriana se podía representar como una curva exponencial, expresión de la cinética de primer orden. Este tipo de cinética también es aplicable a la muerte microbiana cuando se aplica un agente químico a una concentración suficientemente alta. Sin embargo, cuando se aplican menores concentraciones del agente, se pueden encontrar cinéticas diferentes, expresables como curvas sigmoidales.

FACTORES QUE AFECTAN LA POTENCIA DE UN DESINFECTANTE

1) **Concentración del agente y tiempo de actuación**
2) **pH:** El pH afecta tanto a la carga superficial neta de la bacteria como al grado de ionización del agente. En general, las formas ionizadas de los agentes disociables pasan mejor a través de las membranas biológicas, y por lo tanto son más efectivos.
   Los agentes aniónicos suelen ser más efectivos a pH ácidos.
   Los agentes catiónicos muestran más eficacia a pH alcalinos.
3) **Temperatura.** Normalmente, al aumentar la temperatura aumenta la potencia de los desinfectantes. Para muchos agentes la subida de 10 grados supone duplicar la tasa de muerte.
4) **Naturaleza del microorganismo y otros factores asociados a la población microbiana**
   - según la especie empleada: p. ej., el bacilo tuberculoso resiste los hipocloritos mejor que otras bacterias;
   - según la fase de cultivo;
   - dependiendo de la presencia de cápsulas o de esporas (suelen conferir más resistencia);
   - dependiendo del número de microorganismos iniciales.
5) **Presencia de materiales extraños:** La existencia de materia orgánica en el material a tratar (p. ej., sangre, suero, pus) afecta negativamente a la potencia de los desinfectantes de tipo oxidante (como los hipocloritos) y de tipo desnaturalizante de proteínas, hasta el punto que pueden llegar a hacerlos inactivos en cuanto a su poder desinfectante o esterilizante. Por lo tanto, para el empleo eficaz de muchos desinfectantes hay que contar con este factor, determinando previamente el gasto de materia orgánica inerte, o calculando la potencia neta del desinfectante en presencia de la materia orgánica.

ALGUNOS EJEMPLOS DE DESINFECTANTES Y ANTISÉPTICOS Y DE SUS APLICACIONES

Tanto en los laboratorios como en industrias alimentarías es necesario a menudo tratar superficies inertes (mesas, suelos, paredes, maquinaria) con desinfectantes, a ser posible con efecto microbicida. Por ejemplo se pueden usar sales cuaternarias de amonio como el cloruro de benzalconio. El formaldehido es un agente alquilante que en solución al 3-8% sirve bien para tratar superficies.

Los materiales termosensibles que no se pueden esterilizar por calor se pueden esterilizar *en frío* mediante ciertos agentes:

- En los hospitales, para esterilizar termómetros, catéteres, instrumentos, etc., se suele recurrir a un tipo de autoclave que usa el gas óxido de etileno o formaldehido gaseoso (ambos son agentes alquilantes).

- Pequeños objetos se pueden esterilizar en peróxido de hidrógeno (agente oxidante).

- Las cámaras de cría de animales libres de gérmenes se esterilizan con ácido peracético, un fuerte agente oxidante.

Los halógenos son agentes oxidantes muy potentes, y que tienen usos muy importantes:

El yodo es un magnífico antiséptico de la piel (el mejor que se conoce)

El cloro se presenta como cloro gaseoso (Cl_2), hipocloritos y cloraminas. El efecto desinfectante se debe a la liberación de cloro libre (Cl_2); a su vez, el Cl_2 reacciona con el agua para dar ácido hipocloroso (ClOH), que a pH ácido o neutro es un oxidante fuerte.

- **Cloro gaseoso**: a 1-3 ppm se usa en la cloración de aguas para bebida y de aguas de piscinas. Su actividad se ve muy influida (mermada) por la presencia de materia orgánica; por ello, se suele determinar la **demanda de cloro** del agua a tratar. Descontada dicha demanda, el cloro gaseoso mata rápidamente (15-30 segundos) a sólo 1 ppm.
- **Soluciones de hipocloritos**: hipocloritos de sodio, de calcio o de litio. A 200 ppm de cloro se usan ampliamente, ya como líquidos (lejías), o en polvo, en industrias alimentarias y lácteas (para desinfectar el equipamiento y maquinaria que ha de entrar en contacto con los alimentos a procesar), en restaurantes, hoteles, hospitales, etc.

Ciertos ácidos orgánicos se usan como conservantes de alimentos. Tal es el caso del ácido benzoico y del ácido sórbico. Por otro lado, los alimentos fermentados producen sus propios conservantes, como el ácido acético, láctico y propiónico.

QUIMIOTERÁPICOS

Los **quimioterápicos** son sustancias con actividad antimicrobiana (microbicida o microbiostática) con toxicidad suficientemente baja como para poder ser administrados a un organismo por la vía adecuada, hasta alcanzar y mantener concentraciones eficaces en los tejidos. Aunque en el capítulo 1 ya hablamos del arranque y desarrollo de la Quimioterapia, recordemos aquí esta página notable de la historia de la Microbiología:

1900-15	Ehrlich concibe la idea de usar compuestos químicos de síntesis como "balas mágicas" selectivas hacia microorganismos, pero inofensivas para las personas o animales superiores. En 1909 descubre que el salvarsán es efectivo contra la sífilis. Acuña el término "quimioterapia".
1932-35	Domagk, siguiendo los pasos de Ehrlich, descubre la acción del rojo de prontosilo (la primera sulfamida) sobre el neumococo y otros estreptococos *in vivo*
1940	Woods descubre el mecanismo de acción de las sulfamidas. Estamos en plena "Edad de oro de la Quimioterapia de síntesis".
1929	Fleming descubre la penicilina, el primer antibiótico natural, pero fracasa en su intento de purificarlo. La industria farmacéutica se muestra ""indiferente".
1940	Chain y Florey purifican la penicilina. Se usa en la 2ª Guerra Mundial. Comienza la era de los antibióticos naturales
1944	Waksman, un microbiólogo de suelos, ha iniciado una búsqueda de microorganismos productores de antibióticos. Descubre la estreptomicina. Comienza la época dorada de los antibióticos (quimioterápicos naturales), y la búsqueda racional rinde decenas de nuevos antimicrobianos procedentes de Actinomicetos, otras bacterias y hongos.

Las propiedades deseables de un quimioterápico ideal serían las siguientes:

1) Que tenga **toxicidad selectiva**, es decir, actuar según el principio de "bala mágica" que daña al microorganismo respetando al hospedador
2) Que sea **microbicida**, es decir, que mate o inactive irreversiblemente el microorganismo, provocando la pérdida total de viabilidad. En el mundo real, sin embargo, hay muchos quimioterápicos microbiostáticos. En estos casos, los sistemas de defensa natural del hospedador (mecanismos de inmunidad) hacen el resto, eliminando el agente microbiano previamente inhibido por el quimioterápico.
3) Los microorganismos susceptibles **no deberían desarrollar resistencias** al quimioterápico. Pero desgraciadamente, en muchos casos, al cabo de un tiempo de uso del antimicrobiano comienzan a surgir cepas microbianas resistentes al mismo. La quimioterapia es una auténtica escalada de armamentos entre los microorganismos y los humanos, en los que ante una nueva arma de estos últimos los microbios pueden responder al cabo del tiempo con estrategias de resistencia, lo que obliga a un uso racional de los quimioterápicos, y a una búsqueda continua de nuevos agentes.
4) Que el quimioterápico sea efectivo **contra un amplio espectro de microorganismos**. Pero no existe (ni existirá) un solo agente capaz de inhibir a todos los microorganismos. Algunos antibióticos son de amplio espectro, pero no son eficaces contra todos los microorganismos. Por otro lado, existen quimioterápicos de espectro estrecho, pero muy selectivos contra ciertas bacterias que son patógenas importantes.
5) Que **no sea alergénico**, y que **no tenga efectos secundarios**.
6) Que **permanezca de forma activa en plasma, tejidos, etc**. durante el tiempo necesario. A ser posible, que sea soluble en agua y que alcance pronto la concentración terapéutica en los tejidos.

QUIMIOTERÁPICOS DE SÍNTESIS

ANÁLOGOS DE FACTORES DE CRECIMIENTO MICROBIANO

SULFAMIDAS

Los primeros quimioterápicos de síntesis fueron las sulfamidas. Como ya hemos comentado, su descubrimiento y la comprobación de su acción quimioterápica, marcaron el comienzo de la Quimioterapia con criterios racionales. Despertaron gran interés cuando se mostró que su mecanismo de acción depende del hecho de que funcionan como **análogos de metabolitos**, actuando como **inhibidores competitivos** respecto de cierta enzima. La primera sulfamida fue la sulfanilamida (*para*-aminobenceno sulfonamida).

Las sulfamidas tienen un efecto **bacteriostático**. Su acción antibacteriana se debe al hecho de que funcionan como **análogos estructurales del ácido *para*-aminobenzoico (PABA), inhibiendo competitivamente por el acceso a la enzima dihidropteroil-sintetasa** en la ruta de síntesis del ácido tetrahidrofólico (THF).

A partir de la sulfanilamida se sintetizaron desde entonces gran número de derivados por sustitución de uno de los hidrógenos del grupo sulfonamida, formando estos derivados la llamada familia de las **sulfamidas**. Lo que tienen en común las sulfamidas con actividad antibacteriana es:

- tener libre el grupo amino en *para*
- grupo sulfona (-SO_2-) unido al anillo bencénico;

La sustitución del grupo amido unido a la sulfona, aunque no modifica sustancialmente la actividad antibacteriana, puede suponer una serie de ventajas de tipo farmacológico.

OTROS ANÁLOGOS DE FACTORES DE CRECIMIENTO

Las **sulfonas** son derivados de la dapsona (=4,4'-diamino-difenilsulfona). Aunque no se usa contra infecciones normales, ha encontrado una importante aplicación en el tratamiento de la lepra (producida por *Mycobacterium leprae*); de hecho es el quimioterápico de elección para esta enfermedad. Probablemente su mecanismo de acción esté basado en actuar como competidor del PABA.

La **isoniazida** es la hidrazida del ácido isonicotínico (también conocida por sus iniciales inglesas, INH). Como se puede ver, es un análogo estructural de dos vitaminas: la nicotinamida y el piridoxal. Tiene efecto bactericida incluso a bajas concentraciones (1μg/ml) e incluso intracelularmente, lo que permite su empleo contra las especies patógenas de *Mycobacterium*, y en general contra bacterias ácido-alcohol resistentes (*Nocardia, Corynebacterium*). Es el tratamiento más usado contra el bacilo de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*). Ejerce varios efectos:

- interferencia -por mecanismo aún desconocido- con la biosíntesis de la pared celular de las bacterias AAR, que conduce a desorganizar los ácidos micólicos;
- actuación como antimetabolito de nicotinamida y piridoxal.

OTROS QUIMIOTERÁPICOS DE SÍNTESIS: LAS QUINOLONAS

Las quinolonas son quimioterápicos de síntesis que **bloquean la ADN-girasa bacteriana**, uniéndose a la subunidad de tipo A. Recordemos que las bacterias poseen una clase especial de topoisomerasas de tipo II, llamadas girasas, que introducen superenrollamiento negativo en la doble hélice del ADN. La ADN-girasa está constituida por dos subunidades de tipo A y dos de tipo B (A_2B_2); las de tipo A producen los cortes y empalmes sucesivos en la doble cadena, mientras que las subunidades B son ATPasas que proporcionan la energía para la reacción. El bloqueo de las quinolonas sobre la girasa supone que ésta queda "congelada" en la fase en que el ADN está unido al enzima. Ello provoca la acumulación de roturas de doble cadena, lo que conduce a la muerte de la bacteria.

El **ácido nalidíxico** (=4-oxo, 8-azaquinolina) se sintetizó en 1962, siendo el prototipo de quinolona de primera generación. Encontró su aplicación en el tratamiento de infecciones por Gram-negativas del tracto urinario, donde se concentra.

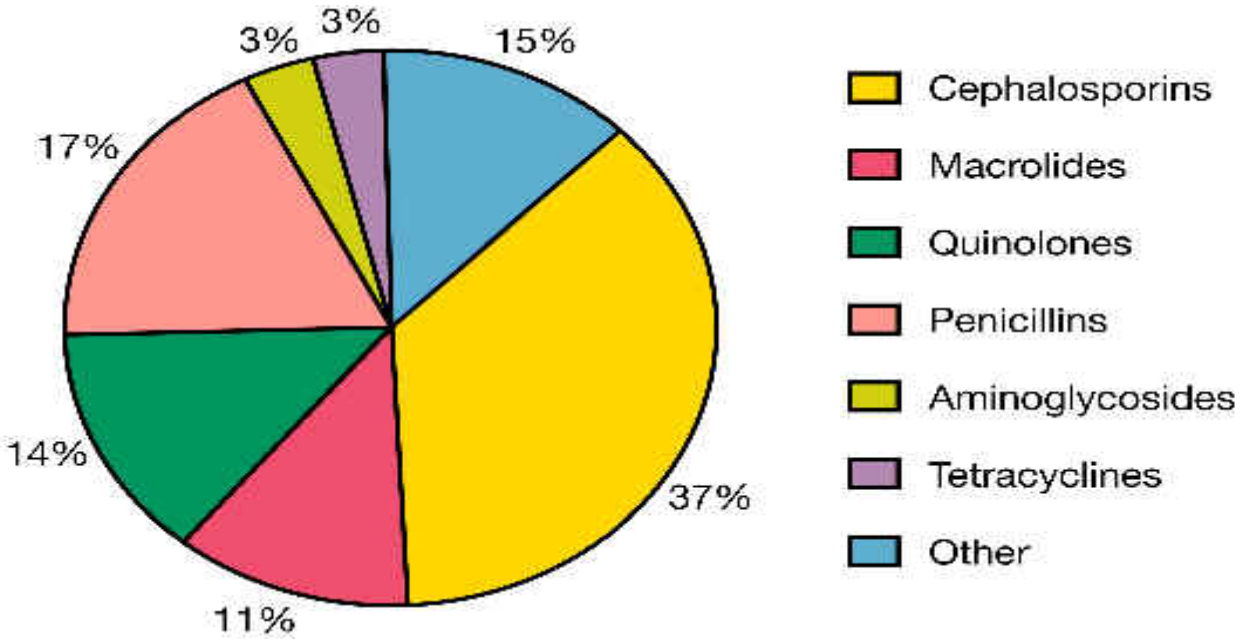
Recientemente se han sintetizado las llamadas **fluoroquinolonas**, como por ejemplo el **ciprofloxacín**. Presentan 600 veces más actividad que el nalidíxico, y actualmente se recetan frecuentemente como quimioterápicos de amplio espectro

ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son sustancias normalmente de bajo peso molecular producidas por seres vivos (antibióticos naturales) o modificadas artificialmente a partir de ellas (antibióticos semisintéticos), que a pequeñas concentraciones tienen efectos antimicrobianos (microbicidas o microbiostáticos), tras ser administrados por vía adecuada a un organismo receptor.

La mayor parte de los antibióticos proceden del metabolismo secundario de microorganismos procariotas (actinomicetos, *Bacillus*, etc.) o eucariotas (hongos de los géneros *Penicillium, Cephalosporium*, etc.).

Se conocen unos 5.000 antibióticos distintos, y cada año se descubre unos 300 nuevos, pero en clínica solo se usa un 1% de los descubiertos. Su importancia económica se pone de manifiesto al pensar en las 100.000 Tm. de antibióticos producidas al año, por un valor equivalente a 3.000 millones de euros, lo cual representa una de las industrias biotecnológicas más importantes.



La mayor parte de los antibióticos comerciales se emplea para tratar enfermedades de etiología bacteriana, aunque algunos se usan contra hongos y levaduras, y unos pocos presentan actividad antitumoral.

Desde el punto de vista químico, se clasifican en grandes familias:

- antibióticos que contienen carbohidratos;
- lactonas macrocíclicas;
- quinonas y compuestos relacionados;
- antibióticos peptídicos y con aminoácidos;
- heterociclos del N;
- heterociclos del O;
- aromáticos;
- alifáticos, etc.

La mayoría de los antibióticos son moléculas relativamente pequeñas pero complejas, con regiones hidrofóbicas que facilitan el transporte al interior celular. Muchos poseen varios anillos, algunos de los cuales mejoran la interacción de la molécula con su diana macromolecular.

Para estudiarlos es más útil agrupar a los antibióticos no por clases según su naturaleza química, sino en función de las "dianas" sobre las que actúan y con las que interfieren:

A) antibióticos que interfieren con la biosíntesis de la pared celular
B) antibióticos que actúan sobre la membrana celular
C) antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas
D) antibióticos que actúan sobre la síntesis de ácidos nucleicos.

Los antibióticos más abundantes, y los mejor estudiados, son los que interfieren con enzimas de la biosíntesis del peptidoglucano de las eubacterias, y los que interfieren con la función del ribosoma eubacteriano (obviamente, esto cumple el requerimiento de "balas mágicas"). A continuación estudiaremos algunos grupos importantes de antibióticos, dando importancia a sus mecanismos de acción

INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE LA PARED CELULAR BACTERIANA

VANCOMICINA

Es un glucopéptido complejo producido por *Streptomyces orientalis*. Se une rápida e irreversiblemente con l extremo D-alanil-D-alanina del pentapéptido del precursor del peptidoglucano que se halla unido al undecaprenil-P (a nivel de membrana citoplásmica), de modo que inhibe la reacción de transglucosidación.

ANTIBIÓTICOS ß-LACTÁMICOS

Todos los antibióticos de este grupo contienen un anillo característico: el anillo ß-lactámico. De ellos, los más importantes son las penicilinas y las cefalosporinas-cefamicinas.

PENICILINAS

Como ya sabemos, las penicilinas fueron los primeros antibióticos naturales en descubrirse, pero en general, todos los ß-lactámicos tienen el mismo mecanismo de acción. Actualmente las penicilinas suponen un 17% del mercado total de antibióticos.

El grupo común a todas las penicilinas es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), que en realidad es un dipéptido ciclado por condensación de L-cys y D-val, que genera el anillo ß-lactámico (anillo A) y el anillo tiazolidínico (anillo B). Las distintas penicilinas se pueden considerar derivadas del 6-APA, sustituyendo el hidroxilo (-OH) del grupo carboxilo por un radical acilo (-R). Este radical acilo es variable de unas penicilinas a otras.

La penicilina natural, purificada por primera vez en los años 40, es la penicilina-G (o benzil-penicilina), en la que el radical acilo es el grupo bencilo (=fenilacético). Esta penicilina presenta una serie de limitaciones e inconvenientes:

- Tiene un espectro estrecho: actúa frente a estreptococos y otros cocos Gram-positivos, pero no frente a la mayoría de bacterias Gram-negativas, porque estas últimas son impermebles debido a su membrana externa.
- Es sensible a ácidos, por lo que no puede ser administrada vía oral (se inactiva a su paso por el estómago).
- Es susceptible a enzimas inactivadoras (penicilinasas) producidas por muchas bacterias.

Para solventar estos problemas se fueron "creando" variantes de esta penicilina que mejoraban algunas de sus cualidades. La mayor parte de estas variantes son **penicilinas semisintéticas**, que se obtienen de la natural introduciendo artificialmente nuevos grupos radicales (-R) con carboxilo en el ácido 6-aminopenicilánico.

1. **Resistentes a penicilinasas** (p. ej., meticilina, oxacilina). Se usan sobre todo frente a cocos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus, S. epidermidis*). Además, son resistentes en medio ácido, lo que permite su administración vía oral.
2. **De espectro ampliado**. Permiten un uso efectivo frente a muchas bacterias Gram-negativas (*Haemophilus influenzae, E. coli, Proteus, Salmonella, Shigella,* etc). Dentro de este grupo, destacamos las "aminopenicilinas", como la **ampicilina**, o la **amoxicilina**: el grupo -NH_2 del radical acilo permite que estas penicilinas puedan atravesar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Resisten los ácidos, pero desgraciadamente sólo tienen la mitad de actividad contra Gram-positivas, y algunas son inactivadas por ß-lactamasas.
3. **Penicilinas anti-*Pseudomonas.*** La carbenicilina se usa frente a *Pseudomonas*, un patógeno oportunista muy peligroso cuando coloniza grandes quemaduras, heridas quirúrgicas, etc.

Mecanismo de acción de las penicilinas y otros antibióticos ß-lactámicos:

Todas las penicilinas (incluidas las semisintéticas), son **bactericidas sobre bacterias en crecimiento**, y poseen el mismo mecanismo: Inhiben el sistema enzimático implicado en la **reacción de transpeptidación** del peptidoglucano naciente, o sea que **impiden los entrecruzamientos entre cadenas de PG**. Ello origina:

- **acumulación de precursores del PG**, sin ensamblar;
- **activación de una serie de autolisinas** (amidasas, glucosidasas), que hidrilozan el PG maduro de la bacteria; si la bacteria se encuentra en un medio hipotónico, termina lisándose.

Por lo tanto, la acción bactericida y lítica de las penicilinas **depende de que la bacteria se encuentre creciendo en un medio hipotónico** (en un medio hipertónico se originan protoplastos y esferoplastos). Cuando la bacteria no está creciendo, no está haciendo renovación ("turnover") de su pared celular, lo que implica que la penicilina no tiene "diana" sobre la que actuar; por lo tanto, en estas condiciones la bacteria puede sobrevivir.

Las penicilinas tienen como dianas a una serie de autolisinas llamadas **proteínas de unión a la penicilina (PBPs)**. Como ya vimos en el capítulo 5, las PBPs son proteínas implicadas en las últimas fases de la síntesis y maduración del PG. Concretamente, las PBPs 1 a 3 **son esenciales** para la bacteria, y son las dianas de las penicilinas que explican la actividad bactericida.

CEFALOSPORINAS Y CEFAMICINAS

El núcleo de estos β-lactámicos es el ácido 7-aminocefalosporánico. El anillo B es el anillo dihidrotiazina (esqueleto de 6 átomos) en lugar del anillo tiazolidina (esqueleto de 5 átomos). Las **cefalosporinas** están producidas por hongos del género *Cephalosporium*, mientras que las **cefamicinas** lo son por ciertas especies de actinomicetos del género *Streptomyces*. Estos antibióticos son muy usados actualmente en clínica, suponiendo casi el 40% del total.

La cefalosporina natural tiene poca actividad, pero sustituyendo artificialmente R_1 y R_2 se obtienen derivados semisintéticos muy activos. Como es habitual con muchos antibióticos de uso clínico, a lo largo de los años la industria farmacéutica ha ido creando sucesivas "generaciones" de estos compuestos, con aplicaciones y ventajas diferentes. Las cefalosporinas y cefamicinas de tercera generación han sustituido en muchos casos a las penicilinas, debido a su mayor espectro de acción y a que resisten mejor las β-lactamasas.

ANTIBIÓTICOS QUE INTERFIEREN EN LA BIOSÍNTESIS DE PROTEINAS

Los antibióticos que interfieren en la síntesis de proteínas son muy variados y abundantes, y la mayoría de ellos funcionan interfiriendo con el ribosoma, sobre todo los que se unen a proteínas ribosómicas o a alguno de los ARN ribosómicos. Nosotros vamos a detenernos principalmente en aquellos antibióticos que afectan a la elongación de la cadena naciente del polipéptido. Obviamente, los más útiles son aquellos que tienen efectos selectivos frente a los ribosomas 70S procarióticos, pero no sobre los 80S eucarióticos. Dentro de ellos, y siguiendo el orden natural del funcionamiento de la elongación de la cadena polipeptídica, podemos agruparlos según la fase concreta de la elongación sobre la que actúan:

1. inhibición del reconocimiento de un aminoacil-ARNt (aa-ARNt) hacia el sitio A del ribosoma;
2. introducción de errores en la lectura de los ARNm;
3. inhibición de la reacción de formación del enlace peptídico;
4. inhibición de la traslocación del peptidil-ARNt (pp-ARNt) desde el sitio A al sitio P.
5. bloqueo de los factores de elongación.

INHIBIDORES DE LA FASE INICIAL DE LA ELONGACIÓN: TETRACICLINAS

Las **tetraciclinas** son antibióticos de muy amplio espectro (frente a Gram-positivas, Gram-negativas, Rickettsias y Clamidias, e incluso Micoplasmas), producidos por distintas especies de *Streptomyces*. Se basan en el cuádruple anillo del naftaceno. Actúan como **bacteriostáticos**, siempre y cuando las bacterias estén en crecimiento activo. Como se puede ver por su espectro, son útiles incluso contra bacterias que viven como parásitos intracelulares (como las Rickettsias), debido a que su **carácter hidrofóbico facilita su difusión a través de membranas**.

Mecanismo de acción: provocan **que la unión del aa-ARNt al sitio A del ribosoma sea inestable y esté distorsionada**, con lo cual se evita la elongación de la cadena. *In vitro* actúan tanto frente a ribosomas 70S como frente a los 80S. Entonces, ¿por qué *in vivo* sólo inhiben a las bacterias? La explicación está en el hecho de que las bacterias transportan complejos tetraciclina-Mg de forma "suicida", cosa que no ocurre en eucariotas.

INDUCTORES DE ERRORES EN LA LECTURA DEL ARNm: AMINOGLUCÓSIDOS

Los **aminoglucósidos** constituyen un grupo amplio y variado de antibióticos de amplio espectro, producidos por diversas especies de *Streptomyces*. Como se puede ver en las figuras, todos tienen en común varios rasgos químicos: son muy polares, policatiónicos; presentan un anillo de aminociclitol (un ciclohexitol o inositol con grupo amino); uno o más azúcares, incluyendo al menos un aminoazúcar (aparte del aminociclitol); así, por ejemplo, la estreptomicina contiene como aminociclitol la llamada estreptidina, mientras que otros aminoglucósidos presentan la 2-desoxiestreptamina).

Ejemplos de de uso clínico	**bacteria productora**
Estreptomicina	*Streptomyces griseus*
Kanamicina	*S. kanamyceticus*
Amikacinas	(derivados semisintéticos de la kanamicina)
Neomicina	*S. fradiae*
Gentamicina	*Micromonospora purpurea*

Mecanismo de acción: se unen a los polirribosomas que están traduciendo el ARNm, **provocando errores en la lectura del ARNm, al distorsionar la estructura del ribosoma. Por lo tanto, la bacteria comienza a sintetizar proteínas defectuosas**; con un efecto final que es bactericida.

La estreptomicina ya no se emplea en clínica humana, pero fue importante históricamente, debido a que constituyó el primer agente eficaz contra la tuberculosis. Actualmente la producción de aminoglucósidos solo constituye el 3% del total de antibióticos, y se emplean como antibióticos de reserva cuando otros fallan.

INHIBIDORES DE LA TRANSLOCACIÓN: MACRÓLIDOS

Los **macrólidos** son antibióticos con grandes anillos lactona unidos a uno o unos pocos azúcares. Suponen un 11% del total de producción de antibióticos. El macrólido prototipo es la **eritromicina**, pero actualmente se usan mucho en clínica dos derivados semisintéticos de ella: la roxitromicina y la claritromicina. La produce un actinomiceto llamado *Saccharopolyspora erithraea*, y es un agente **bacteriostático** que se administra en infecciones de vías respiratorias ocasionadas por *Mycoplasma pneumoniae, Legionella pneumophila* (legionelosis), *Corynebacterium dyphteriae* (difteria) y *Bordetella pertussis* (tosferina).

Mecanismo de acción: se une a la proteína L15, que forma parte del centro peptidil-transferasa de la subunidad grande del ribosoma 70S. **Bloquea el paso de translocación** interfiriendo específicamente con la liberación del ARNt desacilado, es decir, impide que el ARNt "descargado" (una vez que ha cumplido su misión al transferirse el péptido naciente al aa-ARNt del sitio A) salga del sitio P; por lo tanto, el pp-ARNt cargado y situado en el sitio A no puede translocarse al sitio P, y se produce la parada de la síntesis de proteinas.

INHIBIDORES DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LAS EUBACTERIAS: RIFAMICINAS

Las ARN polimerasas de virus, de bacterias y de mamíferos difieren mucho entre sí, por lo que los tipos de antibióticos que las afecten suelen ser bastante selectivos. Recuérdese que las ARN polimerasas eubacterianas constan de un núcleo $\{a_2ßß'\}$ y que requieren el factor σ para la iniciación de la transcripción.

Las **rifamicinas** son antibióticos producidos por *Streptomyces mediterranei*, con buena actividad contra bacterias Gram-positivas y contra *Mycobacterium tuberculosis*. Se han usado en clínica moléculas naturales (como la **rifampicina**) así como derivados semisintéticos (como la **rifampina**). Constan de un anillo cromóforo aromático atravesado por un largo puente de naturaleza alifática. Su mecanismo de acción estriba en la **inhibición del inicio de la transcripción**, uniéndose de modo no covalente a la **subunidad ß** de la ARN polimerasa eubacteriana.

CAPITULO 9

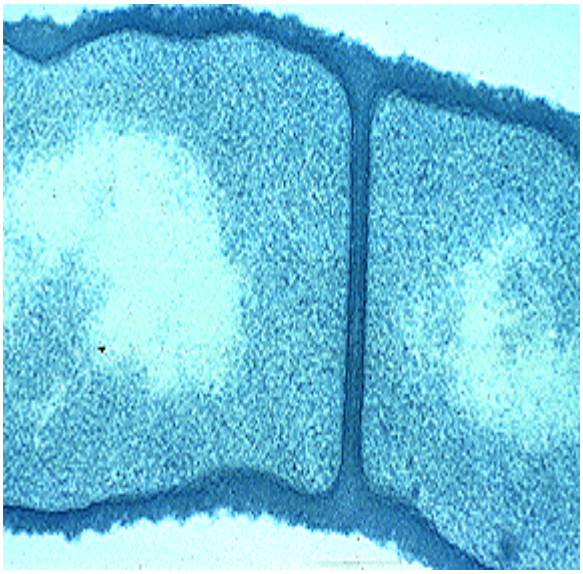
REPRODUCCION BACTERIANA

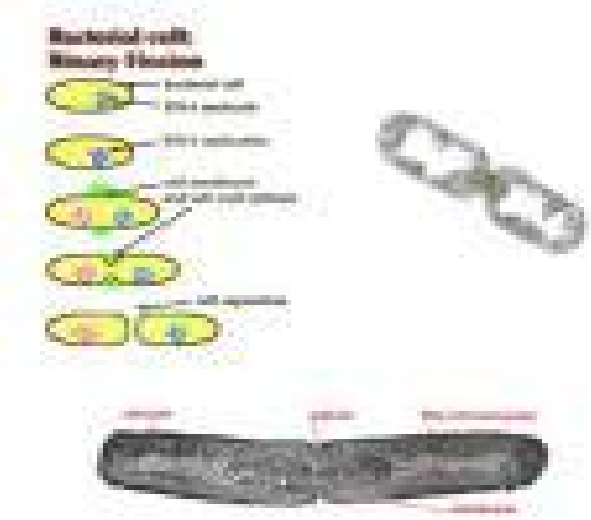
Los microorganismos cuando se sitúan en sustratos favorables, donde estan presentes los nutrientes que necesitan y las condiciones ambientales son propicias, inician un enorme incremento del numero de individuos en tiempo muy cortos, asi tenemos como las bacterias realizan procesos reproductivos. Los mohos producen estructuras de la reproducción en grandes cantidades, originando un vertiginoso aumento de la población microbiana.

Reproducción bacteriana

Fisión binaria

Una célula se divide en dos después de desarrollar una pared transversa. Generalmente es asexual aunque en algunas especies puede ser precedida de conjugación.

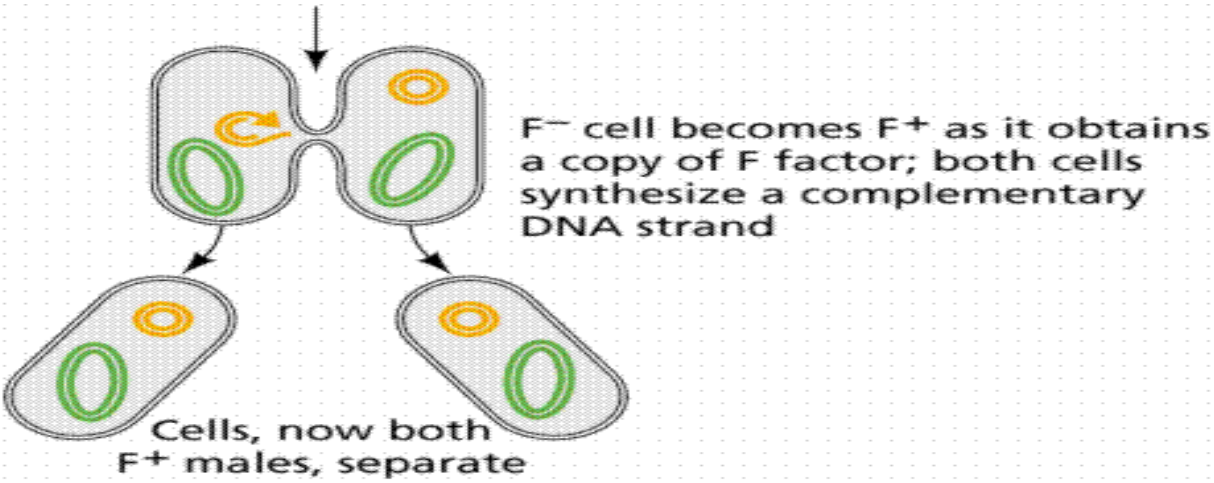




Conjugación Bacteriana

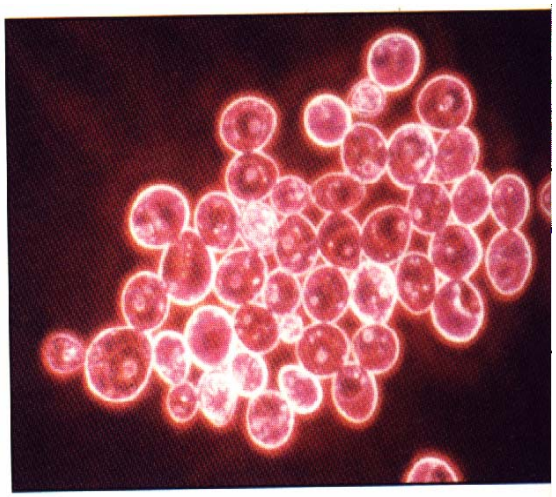
La transferencia de material genético de una célula a otra requiere contacto real. Se realiza mediante la unión a través de una fimbria sexual (“F”).

Las células masculinas F contienen una pieza circular de ADN llamada factor fertilidad o F. Las células femeninas F- carecen de este facto y son receptoras durante la conjugación**.**



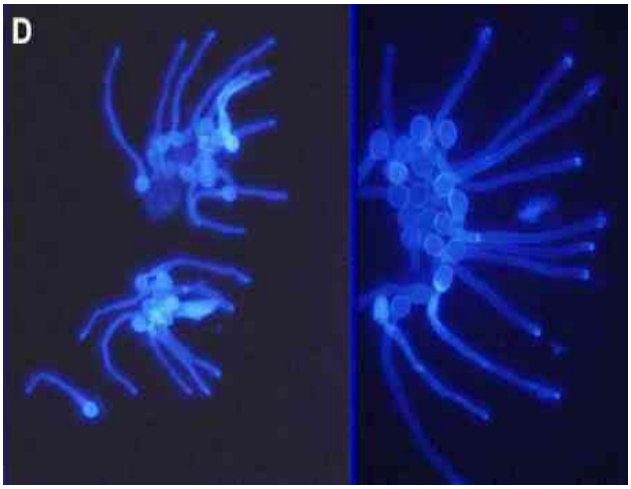
Otras formas de reproducción bacteriana:

- Esporas
- Fragmentación
- Gemación

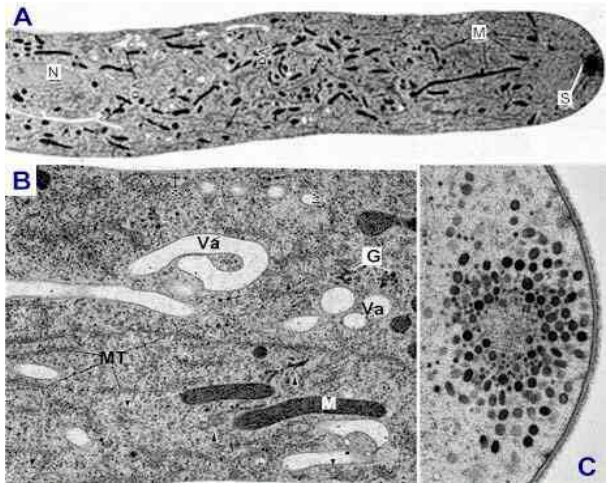


Saccharomyces cerevisiae **(levadura del pan) se pueden observar algunas células gemando.**

Germinación de esporas de hongos



Crecimiento Apical



CRECIMIENTO BACTERIANO

Se define como un incremento ordenado de los principales constituyentes de un organismo. Involucra síntesis de estructuras celulares, ácidos nucleicos, proteínas y otros componentes celulares a partir de nutrientes. Todos los seres vivos toman nutrientes y excretan productos de desecho**.**

Fases de crecimiento

- **Fase lag**

Es un período de adaptación, cuando un cultivo de microorganismo es llevado de un ambiente a otro. Los microorganismo sufren una reorganización tanto en su velocidad de crecimiento como en sus constituyentes macromoleculares. Durante esta etapa la masa celular puede cambiar sin cambiar el número de células.

- **Fase log ó exponencial**

Es un período de balance o de estado estacionario en el crecimiento, durante el cual la velocidad específica de crecimiento es constante. La composición química del medio de cultivo esta cambiando debido a que los nutrientes se están consumiendo y productos metabólicos son producidos.

- **Fase estacionaria**

Los nutrientes se agotan y productos tóxicos se acumulan, crecimiento es más despacio con un número de células constante. La masa total puede permanecer constante pero el número de células puede descender.

- **Fase de decaimiento o muerte**

Un gran número de células muere. Los nutrientes se agotan y productos tóxicos se acumulan

Clasificación de los cultivos microbianos

- **Los cultivos microbianos se distinguen en:**
- **Periódicos (cíclicos)**
- **Continuos**
- **Sincrónicos (simultáneos)**

Periódicos

Se identifican por su carácter cíclico de su desarrollo, en el mismo se delimitan en fases o unidades condicionales con su velocidad de multiplicación y variación en la magnitud de la población

Continuos

Se obtienen cuando se mantienen en una fase, por ejemplo en la fase logarítmica mediante la renovación del sustrato e interrumpida del medio y la sustracción de una parte de la población.

Sincrónicos

La mayor parte de la población se divide simultáneamente.

Tiempo de generación o duplicación

Las bacterias generalmente se reproducen por fisión binaria. En este proceso una célula crece progresivamente para posteriormente dividirse en dos células iguales. *El tiempo requerido para que la célula se divide (o para que la población de un organismo se duplique en número) se conoce como tiempo de generación o duplicación.*

Existen diferentes métodos para medir crecimiento:

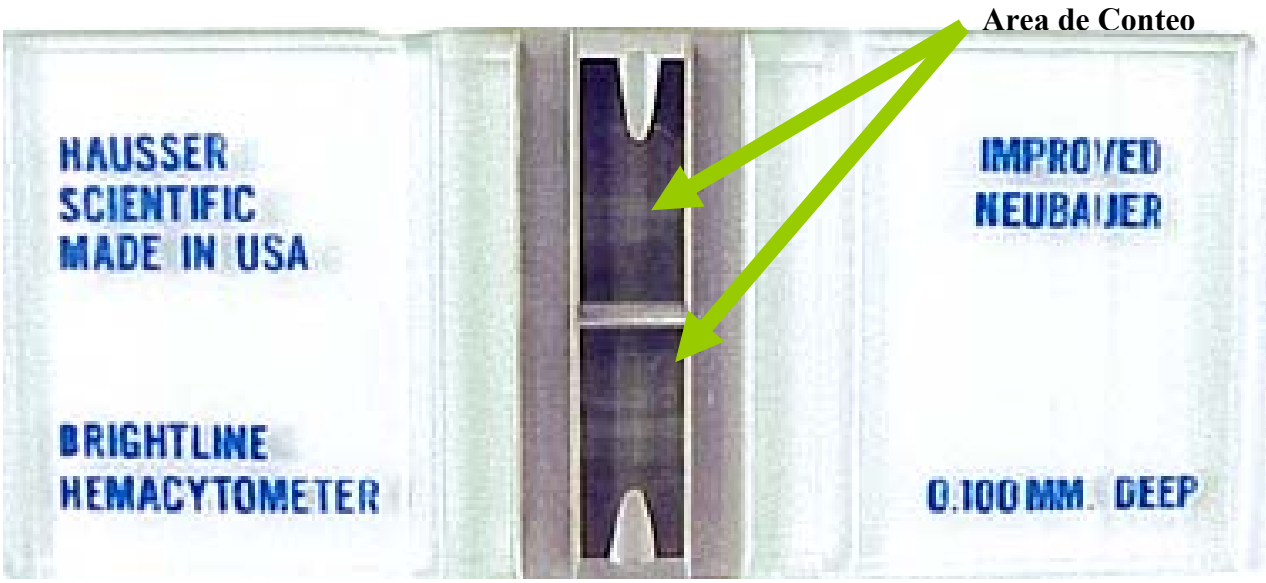
- **Conteo directo al microscopio**
- **Método del número más probable**
- **Dilución en placa**
- **Turbidimetria**
- **Peso seco**
- **Actividad celular**

Determinación de cantidades usando cámaras de conteo

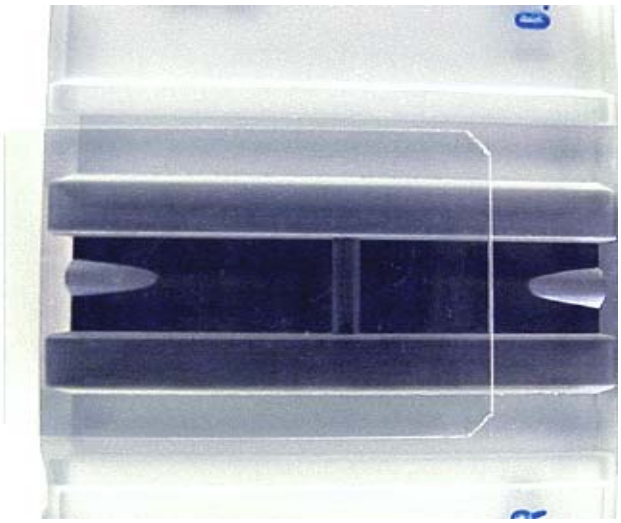
Se puede necesitar contar el número de organismos en un volumen dado de líquido. Este tipo de conteo está asociado con pruebas bacteriológicas o médicas. Existen varias cámaras diseñadas para contar precisamente células u organismos en condiciones diversas.

Hemocitómetro o Cámara cuenta glóbulos

Este sistema tiene 2 áreas de conteo separadas, cada una debe contener de 0.1 mm3 de muestra cuando se cubre con un cubre objetos especial



Cubre objetos especial



Un cubreo bjetos especial, grueso se monta sobre dos barras de cristal y esto forma las dos cámaras

Cámara cuenta hongos de Howard

Fue diseñada especialmente para contar hongos y levaduras en un volumen dado de alimento. La estructura es similar a la des hemocitómetro pero no tiene cuadrícula en el piso de la cámara. Un disco ocular de Howard en el ocular del microscopio se usa para facilitar el conteo

Cámara de conteo de Sedgewick-Rafter

Consiste de un marco de bronce o poliestireno rectangular pegado a un portaobjetos y cubierto con otro. Esto crea una cámara de conteo de 1 ml. Esta cámara es usada en laboratorios de limnología para contar plancton en 1 ml de muestra de agua.

Tiempo de generación o duplicación

Tiempo duplicación promedio en bacterias: 15-20' o bien de 45-60'.
Tiempo duplicación promedio en levaduras: 90-120'.
Tiempo duplicación promedio en hongos: 60-90' o bien de 4-8 horas.

- **Crecimiento críptico**

Se puede observar durante la fase estacionaria, en la que se produce un medio complejo debido a lisis celular a partir de la cual los m.o. pueden crecer como en etapa exponencial.

- **Crecimiento sincronizado**

Son poblaciones de células que están en la misma etapa de crecimiento. Se pierde la sincronía debido a que las diferentes poblaciones no envejecen igual. El crecimiento sincronizado puede ser obtenido mediante la alteración del ambiente (temperatura, o nutrientes). Por ejemplo: Baja temperatura a que los microorganismo aumentan su talla pero no hay división, para después incrementar temperatura a la óptima.

VARIACIONES BACTERIANAS ASOCIADAS A CAMBIOS EN EL GENOTIPO

Los diversos cambios morfológicos, estructurales y funcionales ocurridos a lo largo de la evolución de los seres vivos tienen como base los cambios en los genotipos, que esencialmente pueden ser de dos tipos:

- **mutaciones**
- **recombinaciones subsiguientes a intercambio genético**

Mutación

Desde un mero **punto de vista fenotípico**, mutación es la aparición brusca y espontánea de una variación fenotípica de un individuo, la cual se transmite hereditariamente a la progenie. Desde el **punto de vista genotípico** es cualquier alteración de la secuencia de bases de un segmento de ADN correspondiente a un gen o a un locus (sea éste transcribible o no), aun cuando esta alteración no se refleje en forma de cambio fenotípico observable o detectable

Alelo es cada una de las distintas versiones en que puede presentarse un gen.

- **alelo silvestre**: "forma" (secuencia) de un gen en las bacterias aisladas de su hábitat natural (estirpes silvestres). En la naturaleza es muy frecuente la existencia de **polimorfismo**:existen diversos alelos silvestres diferentes para un mismo *locus*.
- **alelos mutantes**: las distintas "formas" (secuencias) que resultan de mutaciones del alelo silvestre.

Una pareja de conceptos que también conviene incluir aquí es la diferenciación entre mutaciones espontáneas y mutaciones inducidas:

- **Mutaciones espontáneas**: son resultado de la actividad normal de la célula, o de sus interacciones con su medio natural. La mayoría aparecen por errores en los procesos de replicación, reparación o recombinación del ADN. (O sea, para abreviar, serían aquellas mutaciones no provocadas de forma experimental).

- **Mutaciones inducidas**: aquellas provocadas por previa alteración experimental del ADN, bien sea directamente, o indirectamente, por agentes físicos o químicos denominados **mutágenos.**

MUTACIONES QUE AFECTAN A RASGOS MORFOLÓGICOS DE LAS COLONIAS:

Los rasgos culturales de las bacterias son muy fáciles de ver en los cultivos en placas de Petri, por lo que igualmente es fácil detectar cambios en los aspectos de las colonias que pudieran deberse a mutaciones. Antes de nada, vamos a describir brevemente tres tipos de colonias que pueden darse en una misma especie:

- **colonias S (lisas)**: son circulares, de borde liso o continuo; convexas obtusas (plano-convexas); superficie lisa y brillante; se dispersan fácilmente en agua, dando suspensiones homogéneas.
- **colonias M (mucosas)**: son parecidas a las S, pero son convexas más agudas; textura mucosa (al cogerlas con asa de siembra, se arrastra un "moco").
- **colonias R (rugosas)**: a menudo presentan un borde ondulado o festoneado; son planas; textura rugosa, y aspecto mate (no brillante); no se dispersan bien en agua, dando grumos más o menos gruesos.

Pues bien, en muchas especies bacterianas se pueden estudiar **fenómenos de disociación de tipos de colonias en cultivos**, debido a mutaciones que alteran moléculas de las envueltas (p. ej., de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, de la cápsula, etc.). Veamos algunos ejemplos:

- En algunas bacterias se puede observar una disociación M → S, que se suele deber a la pérdida de la capacidad de sintetizar cápsula.
- En algunas bacterias Gram-positivas la disociación S → R se debe a pérdida de la cápsula.
- En bacterias Gram-negativas, las disociación S → R se debe a menudo a la pérdida de la capacidad de sintetizar las cadenas laterales polisacarídicas del LPS (antígeno somático "O").

Muchas de estas disociaciones tienen bastante interés clínico, ya que en bacterias patógenas, el fenotipo mutado (sobre todo el rugoso) implica la pérdida de propiedades de virulencia y de especificidad antigénica.

VARIACIONES POR CAMBIOS EN EL GENOTIPO ASOCIADAS CON TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO

Rasgos generales de la transferencia genética en bacterias:

- La transferencia es **unidireccional**, es decir, tiene una determinada polaridad, existiendo células donadoras y células receptoras.
- La transferencia del genomio de una célula a otra no suele ser total, sino **parcial**.
- Parte del material genético, una vez introducido en la célula receptora, sufre inmediatamente un fenómeno de **recombinación** con el genomio de la receptora. El resto del material de la donadora o no se replica, o se ve destruido.

- Como se puede deducir, tras los procesos de transferencia genética bacteriana, no surge una diploidía total (como es el caso en eucariotas), sino una diploidía parcial, que recibe el nombre de **merodiploidía**. Las células bacterianas diploides parciales reciben la denominación de **merodiploides o merozigotos**. Además, la merodiploidía **suele ser transitoria**.

Este tipo de intercambio genético unidireccional, con diploidía transitoria parcial, se denomina **meromixia**, para distinguirlo de la reproducción sexual de eucariotas.

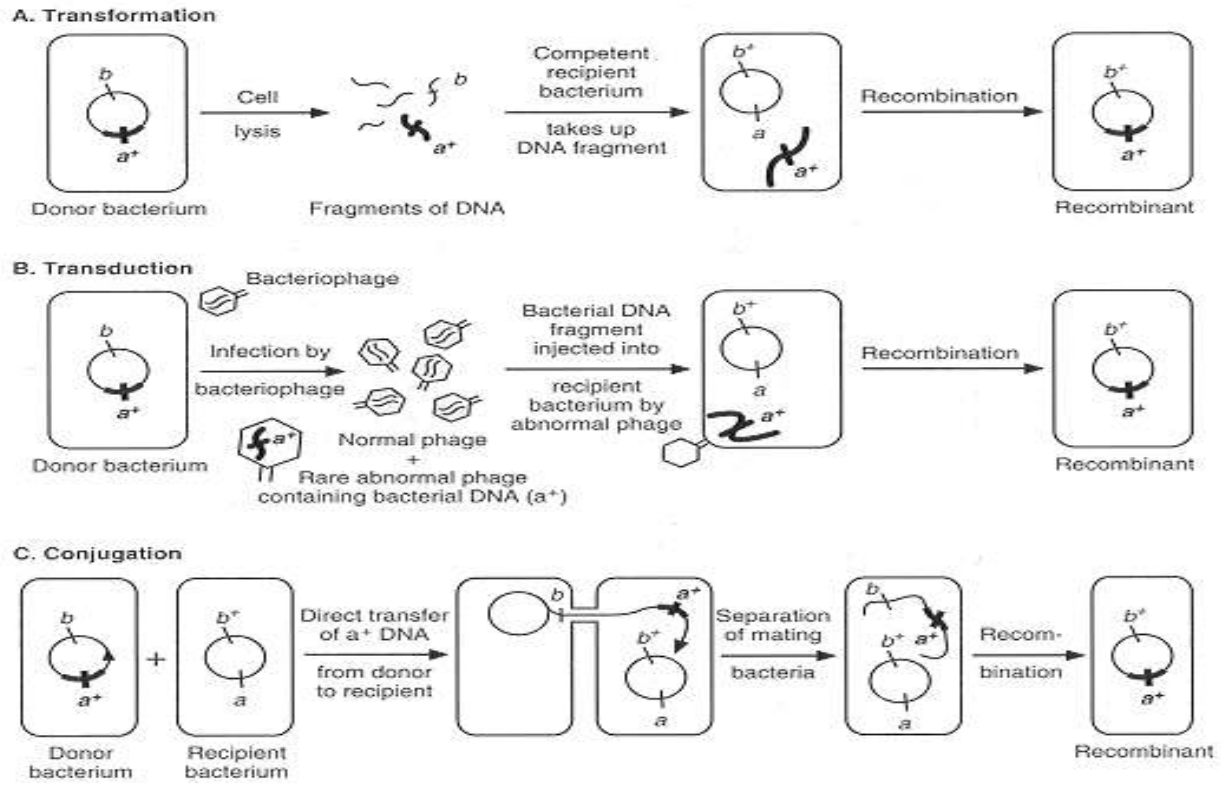
- El genomio de la célula receptora se suele denominar **endogenote**.
- La porción de genomio de la cél. donadora que se transfiere se llama **exogenote**.

Los procesos de transferencia genética en bacterias son de tres grandes tipos, más una variante adicional de uno de ellos:

TRANSFORMACIÓN: captación y asimilación de ADN libre (desnudo), a partir del medio, por parte de una célula receptora.

CONJUGACIÓN: transferencia directa de material genético, promovida por un plásmido, desde una célula donadora a otra receptora, por medio de contactos íntimos entre ambas (puentes de unión). Una variante de la conjugación es la SEXDUCCIÓN: en ella, un trozo definido de mat. genético de la donadora es transferido como parte de un plásmido conjugativo.

TRANSDUCCIÓN: el material genético es transportado desde la cél. donadora a la receptora por medio de un virus bacteriano (o sea, un bacteriófago o simplemente, fago), que actúa como vector.



CAPITULO 10

ESTUDIO DE LOS HONGOS

HONGOS

INTRODUCCIÓN

Los hongos no son plantas ni animales, aunque se parezcan en algunas de sus características tanto a las unas como a los otros. A las plantas, por ser organismos sedentarios que se encuentran fijos a un sustrato y, mientras están vivos, no cesan de crecer. A los animales, pues, aunque las células de los hongos poseen pared como las de las plantas, las paredes celulares fúngicas son ricas en quitina, la misma sustancia que hace duro el esqueleto externo de los insectos

Se estima que existe más de un millón de especies de hongos en el planeta, pero tan sólo unas 70,000 de ellas han sido descritas por los especialistas, lo cual hace evidente la necesidad de contar con más científicos (micólogos o micetólogos) que estudien estos organismos. Mientras tanto, muchas especies de hongos se han extinguido y otras se encuentran amenazadas en todo el mundo.

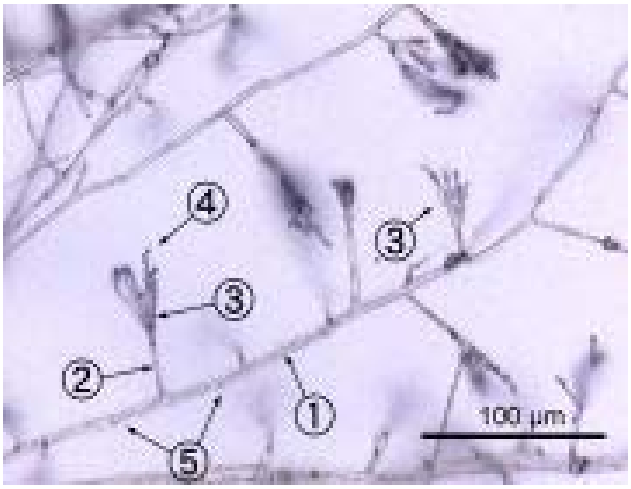
Los hongos tienen distintos hábitos de vida. Los hongos saprófitos, es decir descomponedores de materia orgánica, cumplen una función ecológica de la mayor relevancia pues garantizan el reciclaje de la materia muerta y, por lo tanto, la recirculación de sustancias nutritivas en los ecosistemas.

Los hongos parásitos, que viven sobre o dentro de otros seres vivos, obtienen su alimento de éstos y llegan a producir enfermedad en su hospedero. Los hongos simbiontes que se asocian de manera mutualista con otros organismos constituyen alianzas vivas de beneficio mutuo como por ejemplo los líquenes (asociación de hongo y alga) y las micorrizas (asociación de hongo y raíz de una planta), simbiosis estas de gran importancia en la naturaleza en procesos de colonización de hábitats y de circulación de nutrientes.

Los hongos tienen una gran importancia económica para los humanos: las levaduras son las responsables de la fermentación de la cerveza y el pan, y el cultivo de setas es una gran industria en muchos países.

Estructura

Los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares, aunque frecuentemente en la misma especie se observan fases de uno y otro tipo. Tienen una membrana plasmática (donde predomina el ergosterol en vez de colesterol), núcleo, cromosomas (los hongos son, por lo general, haploides), y orgánulos intracelulares, como (mitocondrias (aunque ningún hongo es estrictamente anaeróbico, algunos pueden crecer en condiciones anaeróbicas), retículo endoplasmático, etc.).



Partes de un hongo: (1) Hifa, (2) Conidióforo, (3) Fiálide, (4) Conidia, y (5) Septas.

La pared celular es rígida, con un componente polisacarídico, hecho de mananos, glucanos y quitina, asociado íntimamente con proteínas. El cuerpo del hongo tiene dos porciones, una reproductiva y otra vegetativa[1]. La parte vegetativa (no tiene clorofila) está compuesta por filamentos que se extienden de los hongos multicelulares y son llamados hifas (usualmente microscópicos), y un conjunto de hifas conforman el micelio[2] (usualmente visible). A menudo las hifas están divididas por tabiques llamados septas. De las hifas se desprenden los conidióforos en el extremo del cual se desprenden los fiálides de los cuales se desprenden los conidios (esporas)[3].

Formas o métodos de identificación en hongos
1.- Aspecto macroscópico de la colonia.

- 2.- Tipo de hifa.
- 3.- Colocación del o los esporóforos.
- 4.- Presencia de esterigmatas (esporangióforo o conidióforo)y el orden que presentan.
- 5.- Forma tamaño y distribución de las esporas.
- 6.- Presencia o no de rhizoides. Solo se presentan en hongos de hifa no septada.

Por ejemplo:Rihizopus, Rhizomucor, Absidia

- 7.- Practicar pruebas de identificación bioquímica.

Filogenia y clasificación de los hongos

A los hongos se los clasificó originalmente como plantas por la inmovilidad y la presencia de pared celular, a pesar de que son heterótrofos. Esto significa que son incapaces de fijar carbono a través de la fotosíntesis, pero usan el carbono fijado por otros organismos para su metabolismo. Actualmente se tiene la creencia generalizada de que los hongos son más cercanos a los animales que a las plantas, y se sitúan junto con los animales en el grupo monofilético, dentro del grupo de los opistocontos.

Los hongos forman un grupo monofilético, lo que significa que todas las variedades de hongos provienen de un ancestro común. El origen monofilético de los hongos se ha confirmado mediante múltiples experimentos de filogenética molecular; los rasgos ancestrales que comparten incluyen la pared celular quitinosa y la heterotrofía por absorción, así como otras características compartidas.

La taxonomía de los hongos está en un estado de rápida modificación, especialmente debido a artículos recientes basados en comparaciones de ADN, que a menudo traslocan las asunciones de los antiguos sistemas de clasificación.[4] No hay un sistema único plenamente aceptado en los niveles taxonómicos más elevados y hay cambios de nombres constantes en cada nivel, desde el nivel de especie hacia arriba y, según el grupo, también a nivel de especie y niveles inferiores. Hay sitios en internet como Index Fungorum, ITIS y Wikispecies que registran los nombres preferidos actualizados (con referencias cruzadas a sinónimos antiguos), pero no siempre concuerdan entre ellos o con los nombres en la wikipedia o en cada variante idiomática.

Pese al carácter monofilético o de un ancestro común, los hongos presentan una sorprendente variabilidad morfológica, dada no solo por el aspecto sino por las dimensiones y características. Así son hongos los *protaxites* de 6 metros de altura y también lo son los mohos y levaduras, las setas (nombre que se da con precisión a los hongos macroscópicos comestibles que crecen sobre el suelo), las subterráneas trufas, o los casi microscópicos como el oidio o los de la tiña u otras micosis (ptiriasis etc.), la roya etc. Los hongos en asociación simbiótica con las vegetales algas constituyen los líquenes.

Clasificación clásica de los hongos

Flammulina velutipes

- Hongos ameboides o mucilaginosos:
  - Mixomicotes (división *Myxomycota*).
  - Ascomicetes (división *Ascomycota*).
  - Plasmodioforomicotes (división *Plasmodiophoromycota*).
- Hongos lisotróficos o absorbotróficos:
  - Pseudohongos u oomicotes (división *Oomycota*).
  - Quitridios (división *Chytridiomycota*).
  - Hongos verdaderos o eumicotes (división *Eumycota*):
- Zigomicetes (clase *Zygomycetes*).
- Ascomicetes (clase *Ascomycetes*).
- Hongos imperfectos (clase *Deuteromycetes*).
- Basidiomicetes (clase *Basidiomycetes*).

Los grupos de la enumeración anterior hasta Oomycota (incluido) no son verdaderos hongos, sino protistas con distintos parentescos cuyas adaptaciones hicieron confundirlos con hongos.

Clasificación actual del reino Fungi

- Quitridiomicetes (división *Chytridiomycota*).
- Zigomicetes (división *Zygomycota*).
- Glomeromicetes (división *Glomeromycota*).
- Basidiomicetes (división *Basidiomycota*).
- Ascomycetes (división *Ascomycota*).

Caracteres diferenciales

- *Nivel celular*: Eucariotas
- *Nutrición*: Osmótrofa (absorción)

- *Metabolismo del oxígeno* (respiración): aerobios ó anaerobios facultativos.
- *Reproducción y desarrollo*: reproducción sexual, con gametos generalmente iguales, y multiplicación asexual por esporas resistentes
- *Organización*: Los más conocidos son pluricelulares, con células en filamentos llamados hifas, cuyo conjunto forma un micelio. Carecen de fases móviles, tales como formas flageladas, con la excepción de los gametos masculinos y las esporas de algunas formas filogenéticamente "primitivas" (los Chytridiomycota).
- *Estructura y funciones*: sin plasmodesmos (puentes de citoplasma entre células). Unicelulares como la levadura de la cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) o con micelio pluricelular constituido por hifas. Con movimientos intracelulares. En las paredes hay poros.

Pared celular con quitina.

Caracteres morfológicos: los principales caracteres macroscópicos de los hongos, son los de su cuerpo fructífero o *seta*.

Managua
km 12 ½ carretera Norte
Apartado No. 453
Tel.: 2331501 • 2331188
www.una.edu.ni