6

REPRODUCCIÓN Y CRECIMIENTO MICROBIANO

REPRODUCCIÓN Y CRECIMIENTO MICROBIANO. Crecimiento individual y crecimiento de poblaciones. Matemática del crecimiento microbiano. Fases de la curva de crecimiento de microorganismos. Métodos para la estimación del crecimiento microbiano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Al finalizar el tema el estudiante podrá:

1. Describir el proceso de fisión binaria de las bacterias.

2. Establecer la diferencia entre crecimiento individual y crecimiento de poblaciones.

3. Definir Tiempo de Generación.

4. Calcular el Tiempo de Generación por el método gráfico.

5. Deducir la fórmula de crecimiento exponencial.

6. Dadas 3 de las variables de la fórmula de crecimiento exponencial, calcular el dato que falta.

7. Dados los resultados de un experimento de multiplicación bacteriana, hacer la gráfica correspondiente, identificando cada una de sus fases.

8. Resumir las características de cada una de las fases de la curva de crecimiento microbiano.

9. Enumerar los métodos para medir el crecimiento microbiano y explicar, resumidamente, el fundamento de cada uno de ellos.

10. Dados los resultados de una determinación del número de células viables o del número de células viables, realizar los cálculos correspondientes.

11. Explicar el efecto que tienen los cambios en la concentración de nutrientes, sobre el crecimiento bacteriano.

12. Describir las modalidades de reproducción de los hongos.

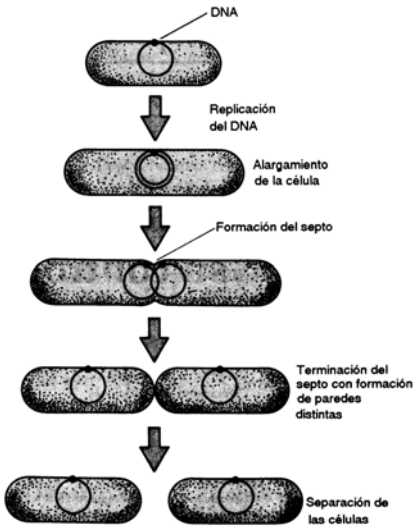
13. Explicar el ciclo de multiplicación de virus animales.

PROCESOS DE REPRODUCCIÓN DE LAS BACTERIAS

Entre los procesos de reproducción de las bacterias tenemos**:**

FISIÓN BINARIA

Es un proceso en el cual de la división de una célula resultan dos (2) células, usualmente ambas células hijas tienen el mismo tamaño y forma. Este es el proceso más común y sin duda el más importante en el ciclo de crecimiento de las poblaciones bacterianas. En un cultivo en crecimiento la célula bacteriana aumenta de tamaño, replica su ADN y la pared celular y la membrana citoplasmática comienzan a crecer hacia adentro a partir de direcciones opuestas formando una partición conocida como septo. A cada lado del septo se ubica una copia del cromosoma bacteriano y los otros constituyentes celulares que le permitan a cada célula hija vivir como célula independiente. Luego se separan como dos células hijas resultantes de la división de la célula madre original.



Existen en las bacterias otros procesos reproductivos pero son menos comunes, por ejemplo especies del género *Streptomyces* producen muchas **esporas reproductivas** por microorganismo y cada espora da origen a un nuevo microorganismo. Otras bacterias como las del género *Nocardia***,** presentan extensos **crecimientos filamentosos** los cuales se fragmentan en pequeñas unidades que al desarrollarse originan nuevos microorganismos. Algunas bacterias como las especies del género *Hyphomicrobium* se reproducen por **gemación**, lo cual consiste en que una célula madre emite un brote, éste aumenta de tamaño y posteriormente se separa como una nueva célula.

CRECIMIENTO

Se define crecimiento como un aumento en la cantidad de constituyentes y estructuras celulares, cuando hay crecimiento en ausencia de división celular hay aumento en el tamaño y peso de la célula. Mientras que cuando el crecimiento es seguido de división celular hay un aumento en el número de células.

Es importante distinguir entre el crecimiento de células individuales y el crecimiento de poblaciones, ya que en los microorganismos debido a su pequeño tamaño no se hacen estudios de crecimiento individual sino estudios de crecimiento de poblaciones.

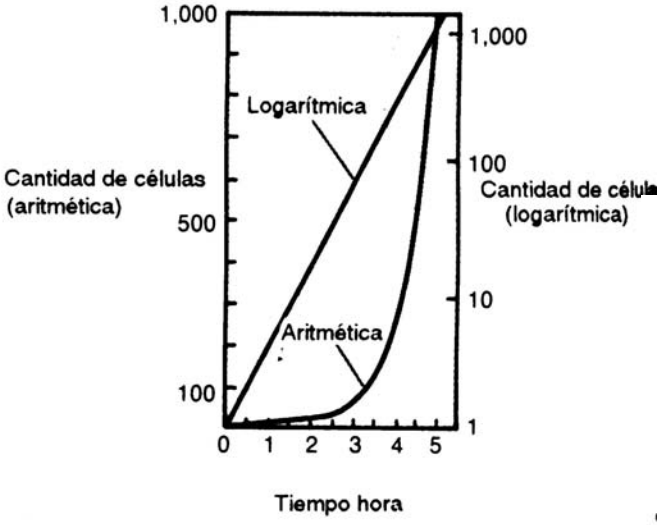
El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división. El crecimiento de una población ocurre de una manera exponencial. El crecimiento exponencial es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide dando dos (2) células hijas, las cuales al dividirse darán cada una dos células hijas, así es que en cada período de división la población se duplica.

La velocidad de crecimiento exponencial se expresa como **tiempo de generación** (G) y este se define como el tiempo que tarda una población en duplicarse. Los tiempos de generación varían ampliamente entre los microorganismos, algunos crecen rápidamente y presentan tiempos de generación de unos 30 minutos y otros tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días.

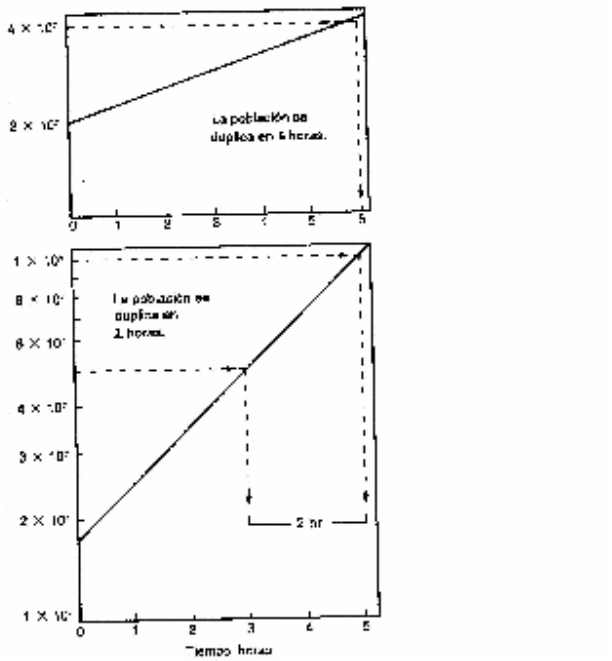
En la siguiente tabla se presenta un experimento de crecimiento partiendo de una célula (bacteria), que tiene un tiempo de generación de 30 minutos.

Tiempo (horas)	Número de células	Log del número de células
0	1	0
0,5	2	0,301
1	4	0,602
1,5	8	0,903
2	16	1,204
2,5	32	1,505
3	64	1,806
3,5	128	2,107
4	256	2,408
4,5	512	2,709
5	1024	3,0103
.	.	.
.	.	.
10	1048576	6,021

En un gráfico de los resultados del número de células tanto en escala aritmética como en escala logarítmica en función del tiempo transcurrido, podemos observar que en el gráfico aritmético se obtiene una curva con una pendiente que crece constantemente, mientras que si transformamos el número de células en logaritmo y se grafican estos valores en escala logarítmica y el tiempo en escala aritmética se obtiene una línea recta.



Este tipo de gráfica semilogarítmica es la forma más simple para determinar el tiempo de generación por el método gráfico, como podemos observar en la gráfica siguiente.



MATEMATICA DEL CRECIMIENTO EXPONENCIAL

Cuando se inocula una bacteria en un medio y ha transcurrido el tiempo de generación de este microorganismo, se forman dos células, después de otra generación cuatro células después de la tercera generación ocho células. Es decir en cada generación sucesiva se duplica la población. La relación que existe entre el número de células y las generaciones de un cultivo creciendo en forma exponencial, puede deducirse matemáticamente de la manera siguiente:

Se designa como:

x = Nº de bacterias al tiempo 0

y = Nº de bacterias al tiempo t

t = tiempo en crecimiento exponencial

Al tiempo 0 y = x

Después de: 1 generación $y = x.2$

2 generaciones $y = (x.2)\ 2 = 2^2 x$

3 generaciones $y = (2^2 x)\ 2 = 2^3 x$

n generaciones $y = 2^n x$ (1)

Para calcular n = (número de generaciones)

Resolviendo la ecuación (1) para n se tiene:

$$\log y = \log x + n \log 2$$

$$n = \frac{\log y - \log x}{\log 2}$$

Si se sustituye en la ecuación anterior log 2 por su valor 0.3010, se tiene que 1/0.3010 = 3.3

$$n = 3.3 \log y/x$$

Por consiguiente, aplicando la ecuación anterior puede calcularse el número de generaciones que han tenido lugar, siempre que se conozca la población inicial x, y la población y después del tiempo t.

El tiempo de generación G es igual a t (tiempo transcurrido en fase exponencial para llegar de x a y) dividido por el número de generaciones n, o sea:

$$G = t/n$$

Ejemplo

Se tienen 1000 bacterias en un medio de cultivo óptimo y después de 4 horas de incubación, creciendo exponencialmente, se obtienen 100.000 bacterias. Calcule el tiempo de generación.

x = 1000
y = 100.000
T = 4 horas
G =?

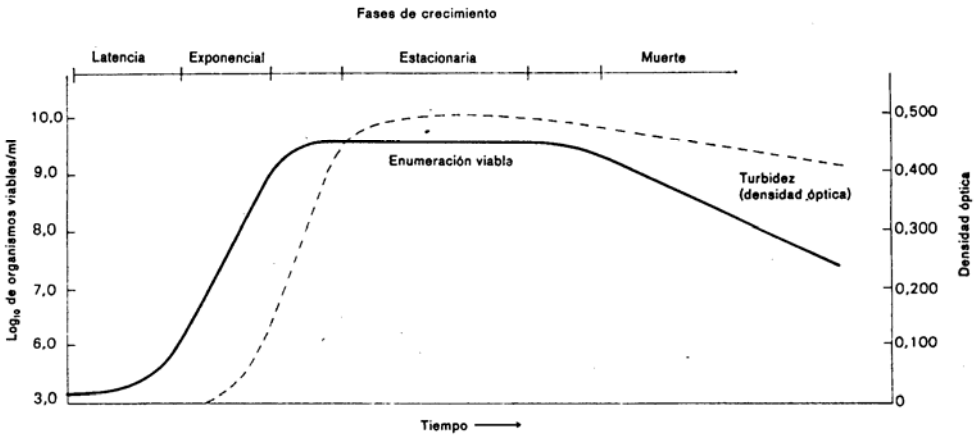
n = 3.3 log y/x n = 3.3 log 100.000/1000 = 6.6 generaciones

G =T / n

G = 240 / 6.6 = 36,36 minutos

CURVA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

En la figura se ilustra una curva de crecimiento de una población bacteriana. Esta curva se divide en cuatro fases denominadas fase de latencia, fase exponencial o fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte.



Fase de latencia

Cuando una población bacteriana es inoculada en medio fresco, el crecimiento usualmente no comienza de inmediato sino después de un tiempo llamado de **latencia**, que puede ser corto o largo dependiendo de las condiciones.

La fase de latencia representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente.

En esta fase no hay incremento en el número de células, pero hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células.

Si un cultivo que está creciendo en fase exponencial es inoculado al mismo medio de cultivo bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa fase de latencia y el crecimiento exponencial sigue a la misma velocidad. Si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, generalmente se presenta la fase de latencia esto se debe a que las células generalmente agotan una serie de coenzimas esenciales u otros constituyentes celulares y se requiere cierto tiempo para su resíntesis.

También se observa latencia cuando el inóculo está formado por células que han sido dañadas pero no muertas, bien sea por tratamiento con calor, radiaciones o sustancias químicas, puesto que requieren reparar dicho daño.

En el caso de que una población se transfiera de un medio de cultivo rico a un medio pobre, se observa latencia puesto que es necesario que las células para poder seguir creciendo tengan una serie de enzimas para poder sintetizar algunos metabolitos esenciales que no están presentes en el medio.

Fase exponencial o fase logarítmica

Es el período de la curva de crecimiento en el cual el microorganismo crece exponencialmente, es decir que cada vez que pasa un tiempo de generación la población se duplica. Bajo condiciones apropiadas la velocidad de crecimiento es máxima. Las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo, etc.) afectan a la velocidad de crecimiento exponencial.

Fase estacionaria

En cultivos en recipientes cerrados una población no puede crecer indefinidamente en forma exponencial. Las limitaciones del crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por una combinación de las causas anteriores. Este periodo durante el cual cesa el crecimiento se conoce como fase estacionaria.

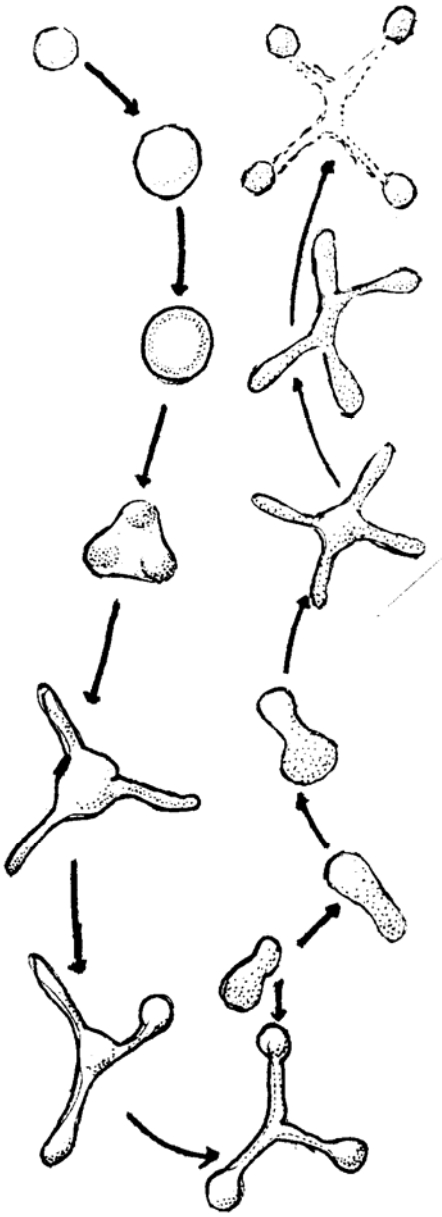
Fase de muerte

Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero va a comenzar una dismi-

nución progresiva en el número de células viables y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte.

FORMA DE REPLICACIÓN DE LOS MICOPLASMAS

Los micoplasmas se dividen por fisión, pero este proceso no va a ser idéntico al de las otras bacterias, pues en el caso de los micoplasmas la división citoplasmática no está sincronizada con la replicación del genoma como ocurre en las otras bacterias, sino que la división citoplasmática está retardada resultando en la formación de filamentos multinucleados, los cuales posteriormente forman cadenas de células esféricas y luego se fragmentan dando origen a células individuales.



Ciclo de división celular de un micoplasma en medio líquido

REPRODUCCIÓN DE LAS RICKETTSIAS

Las rickettsias se reproducen por fisión binaria. Ninguna especie ha sido cultivada extracelularmente y se desconocen sus requerimientos nutricionales. En el laboratorio se cultivan en el saco vitelino de embriones de pollo o en cultivos de tejidos. Generalmente crecen en el citoplasma de la célula huésped

REPRODUCCIÓN DE LAS CLAMIDIAS

Las clamidias se replican por fisión binaria, pero sufren variaciones morfológicas durante su ciclo de replicación, el cual resumidamente consiste en lo siguiente:

1. Las formas infecciosas denominadas cuerpos elementales (C.E.), miden 0,3 µm de diámetro aproximadamente, se unen a la célula huésped.

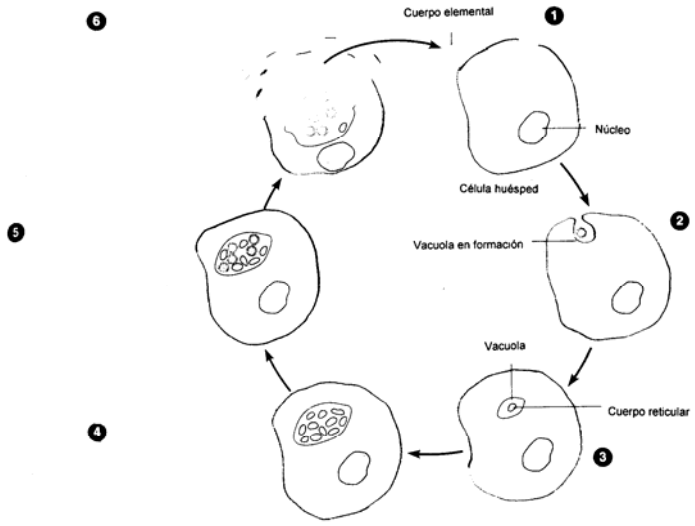
2. Los cuerpos elementales entran a la célula huésped mediante un mecanismo similar a la fagocitosis, al cual se le denomina endocitosis. Una vacuola derivada de la membrana celular rodea los cuerpos elementales.

3. Por un mecanismo no muy bien entendido, una hora después, los cuerpos elementales sufren un proceso de reorganización y cambios metabólicos, transformándose en unas estructuras que miden alrededor de 1 µm de diámetro, y son menos densos que los cuerpos elementales, a estas estructuras se les denomina cuerpos iniciales (C.I.) o cuerpos reticulares (C.R.).

4. Estos cuerpos reticulares o iniciales comienzan a dividirse por fisión binaria dentro de la vacuola, utilizando energía derivada del ATP generado por la célula huésped, produciendo múltiples cuerpos reticulares.

5. Después de 24 a 72 horas los cuerpos iniciales se reorganizan y condensan para formar los nuevos cuerpos elementales.

6. La célula huésped se rompe y libera los cuerpos elementales que son capaces de infectar otras células.



MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento microbiano se mide por cambios sucesivos en el número de células o por el aumento de peso de la masa de las células. Hay varios métodos para enumerar las células o estimar la masa de éstas.

1. - Determinación del número de células totales

1.1 Recuento directo mediante contadores electrónicos

Los contadores electrónicos diseñados para contar glóbulos rojos se puede usar para este fin. Esencialmente un contador electrónico consta de dos cámaras que están separadas por un material que no conduce la corriente, en este material no conductor hay un orificio de un tamaño similar al de las células a ser contadas. Cada cámara contiene un electrodo, la suspensión de células a ser contadas se coloca en una de las cámaras y se aplica presión para que las células pasen a la otra cámara a través del orificio, cada vez que una célula pasa a través del orificio ocasiona un cambio en la conductividad eléctrica que es registrado por un dispositivo electrónico y de esta manera el contador indica el número de células en esa suspensión.

Las limitaciones de este método son las siguientes:

- Se cuentan células vivas y muertas.
- Las suspensiones deben estar libres de partículas diferentes a los microorganismos que estamos contando por que el aparato no puede distinguir entre una u otra.

1.2 Recuento directo al microscopio

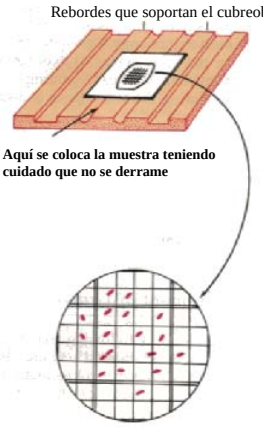
Se determina directamente el número de células contándolas al microscopio con la ayuda de cámaras especiales que albergan un volumen conocido de liquido (Hemocitómetros, Cámara de Petroff- Hausser).

El recuento directo al microscopio es tedioso, pero es una forma rápida de estimar el número de células microbianas. Sin embargo, presenta algunas limitaciones:

- No se pueden distinguir las células vivas de las células muertas.
- Las células muy pequeñas son difíciles de contar.
- La precisión es difícil de lograr
- El método no es adecuado para suspensiones celulares de baja densidad, es decir las soluciones deben contener aproximadamente 10^7 células/mL o más.

A continuación se desarrolla, como ejemplo, el recuento directo al microscopio utilizando la cámara de Petroff-Hausser. En este método la suspensión de la muestra se coloca en la cavidad cuadriculada de dimensiones conocidas de la cámara, y se tapa con el cubre objetos. Como se conoce el área de las cuadrículas y la altura de la cámara de recuento, el volumen ocupado por la suspensión en cada cuadrículas queda determinado. Por tanto, para obtener el número de bacterias por mililitro de suspensión, todo lo que se requiere es contar el número de microorganismos en varias cuadriculas, calcular el promedio de recuento por cuadrícula y multiplicar este promedio por el factor correspondiente.

Cámara de Petroff-Hausser



Observación al microscopio: se cuentan todas las células del cuadro grande= 12 células (en la práctica se cuentan varios cuadros y se hace el promedio

El retículo del fondo está dividido en 25 cuadrados

Volumen de la cámara= 0,02 mm^3

Área de la cámara 1 mm^2

Para calcular el número de células por mL de muestra:

12 x 25 = 300 (número de células en 0,02 mm^3)

300 x 50= 15000 (número de células en 1 mm^3)

150000 x 1000 = 1,5 x 10^7 (número de células en 1 mL)

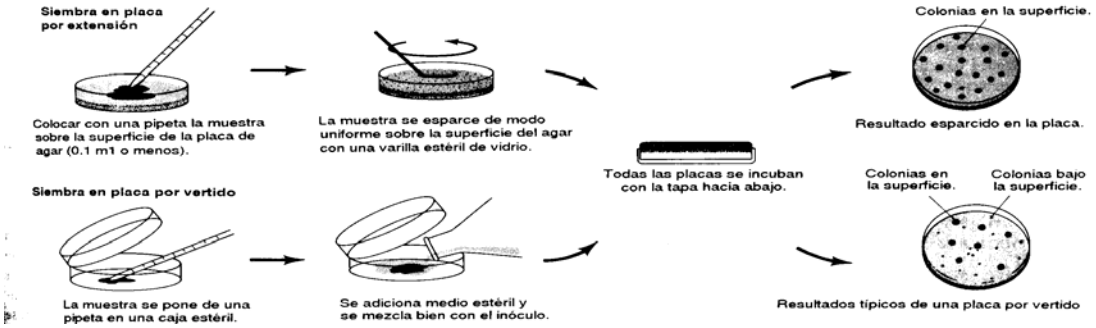
2. - Determinación de células viables

En los métodos anteriores se determina el número de células totales, pero en muchos casos únicamente interesa contar células viables.

Se define como célula viable, aquella célula que es capaz de dividirse y forma una progenie y la manera usual para realizar un recuento de células viables es determinando el número de células en la muestra, capaces de formar colonias sobre un medio de cultivo sólido (agar) y esto se conoce como recuento en placa.

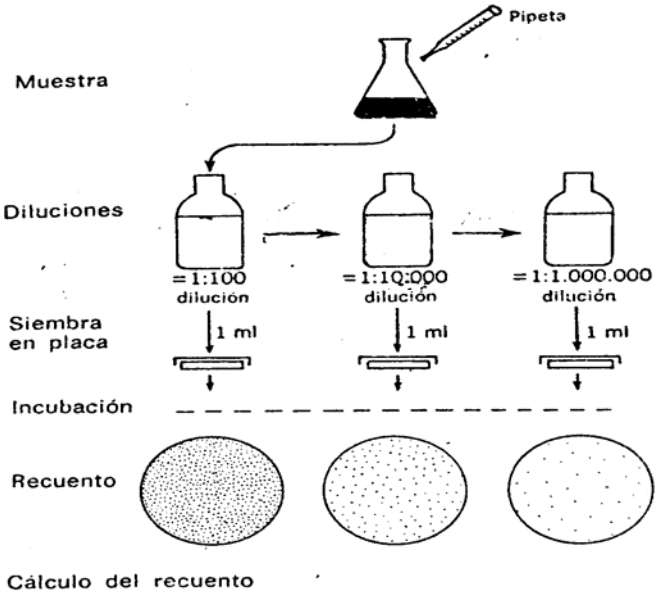
En este procedimiento se realizan diluciones seriadas de la muestra y se inoculan pequeños volúmenes conocidos, de cada una de las diluciones, en placas de Petri conteniendo un medio sólido adecuado estéril y se extiende con una varilla de vidrio (método de siembra en placa por extensión o diseminación) o en placas de Petri estériles a las cuales se les adiciona un medio sólido fundido y enfriado a 45ºC y se mezclan bien (método de siembra por incorporación o de vertido en placa), luego se incuban en las condiciones optimas hasta que aparezcan las colonias correspondientes. Se asume que cada colonia proviene de la división sucesiva de una sola célula, conociendo el volumen sembrado y la dilución de la cual proviene y contando el número de colonias en la placa correspondiente se puede calcular el número de células viables en la muestra. Debido a que es difícil saber si una sola

bacteria dio origen a una colonia, se expresa usualmente el número de células viables como unidades formadoras de colonias (UFC). Para realizar el recuento se seleccionan las placas de la que contengan entre 25 y 250 colonias.



A pesar de las deficiencias que pueda presentar la técnica del recuento en placas, se usa frecuentemente, y con resultados satisfactorios, para la estimación de las poblaciones bacterianas en la leche, agua, y otros productos. Es fácil de realizar y se adapta a la medición de poblaciones de cualquier densidad.

En el siguiente esquema se presenta un ejemplo de un recuento en placa haciendo diluciones seriadas con un factor de dilución de 100, para ello se toma 1 mL de la muestra, la cual puede ser un cultivo de bacterias o cualquier otra muestra que contenga bacterias en suspensión, se añade a un frasco de dilución que contiene 99 mL del diluente adecuado, se agita y se toma de esta primera dilución (1:100 ó 10^{-2}) 1 mL y se transfiere a un segundo frasco de dilución que contiene 99 mL del diluente adecuado, se agita y se toma de esta segunda dilución (1:10.000 ó 10^{-4}) 1 mL y se transfiere a un tercer frasco de dilución que contiene 99 mL del diluente adecuado (esa corresponde a la dilución 1:1.000.000 ó 10^{-6}). De cada se siembran por triplicado muestras de 1 mL y se incuban en posición invertida por 24 horas o más y se cuentan las colonias.



Por ejemplo si el promedio de las 3 placas de la dilución 1/1000, es de 32 colonias entonces el recuento es de 32.000 UFC/mL de muestra.

Otro procedimiento de recuento de células viables es el de la técnica de la membrana filtrante y consiste en hacer pasar la muestra que contiene los microorganismos a través de una membrana de acetato de celulosa (0.45μm) colocada en un dispositivo de filtración. Los microorganismos quedan retenidos en la membrana filtrante, la cual se retira después de terminado el proceso de filtración y se coloca en una placa de Petri que contiene una almohadilla humedecida con un medio de cultivo adecuado. Después del periodo de incubación, aparecen sobre la superficie de la membrana las colonias originadas por el crecimiento de los microorganismos.

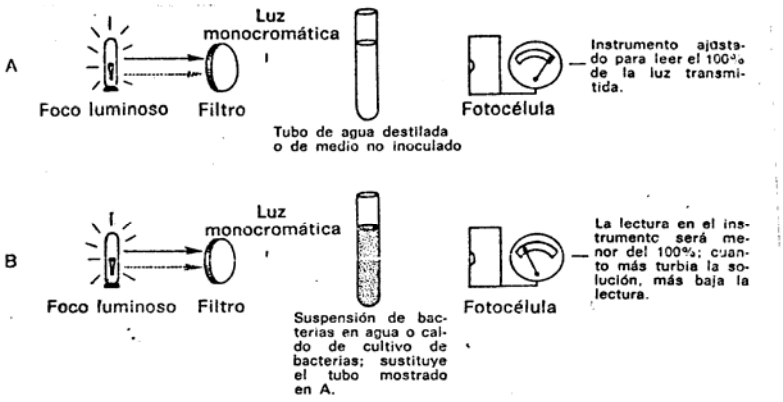
Esta técnica permite el análisis de grandes cantidades de la muestra, tratándose por ejemplo de agua o de aire, pueden filtrarse a través de la membrana grandes volúmenes, concentrando así la población microbiana.

3. Determinación de la masa microbiana

Para muchos estudios especialmente aquellos relacionados con la bioquímica de los procesos de crecimiento, se prefiere determinar la masa de la población más que el número de células presentes. La masa se puede determinar directamente determinando el peso seco o húmedo de la muestra. También se puede determinar el contenido de nitrógeno o el contenido de proteínas o de ADN.

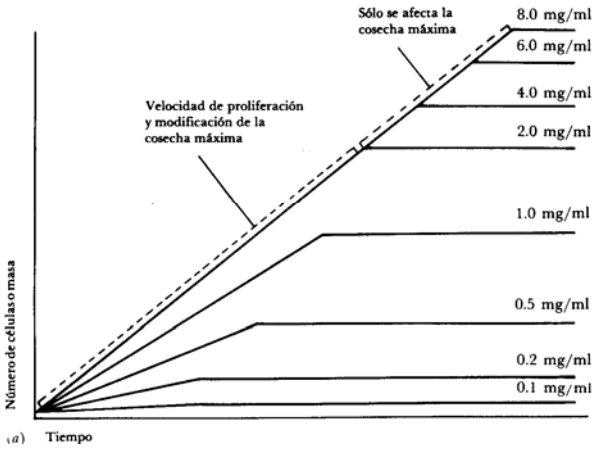
Otra forma de estimar la masa celular de una manera indirecta es determinando la actividad metabólica de la célula por ejemplo determinando el consumo de oxígeno o producción de dióxido de carbono. Asumiendo que la cantidad del producto metabólico está en proporción directa al número de bacterias presentes en la población.

Un método más sencillo y útil para obtener la estimación relativa de la masa bacteriana es utilizar métodos ópticos (turbidimétricos) que consisten en medir la turbidez, ya que, dentro de ciertos límites, las suspensiones bacterianas dispersan la luz proporcionalmente a su concentración.



EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NUTRIENTES SOBRE EL CRECIMIENTO

Como podemos observar en la figura siguiente, a medida que aumenta la concentración de nutrientes aumenta la velocidad de crecimiento hasta llegar a una concentración que ya no es limitante y se sigue aumentando no aumentará la velocidad de crecimiento. También la concentración de nutrientes tiene efecto sobre la "cosecha máxima" o crecimiento total ya que una gran parte del nutriente es convertido en masa celular, si se limita la cantidad de nutriente se limitará también la cantidad de material celular.



PROCEDIMIENTOS DE REPRODUCCIÓN DE LOS HONGOS

Los hongos pueden reproducirse por procesos asexuales y procesos sexuales.

Reproducción asexual

Los procesos asexuales implican división de los núcleos y formación de nuevos hongos sin participación de gametos y sin fusión nuclear.

Se conocen 3 mecanismos de reproducción asexual:

1. Esporulación seguida de germinación de las esporas.
2. Gemación.
3. Fragmentación de hifas.

1. **Esporas asexuales**

   No presentan latencia, es decir ellas pueden germinar cuando dispongan de humedad aún en ausencia de nutrientes. Existen varios tipos de esporas asexuales:

   a. Clamidosporas: sporas esféricas u ovoides de pared gruesa que se forman dentro de las hifas somáticas. Son más resistentes al calor y a la desecación que las otras esporas asexuales.

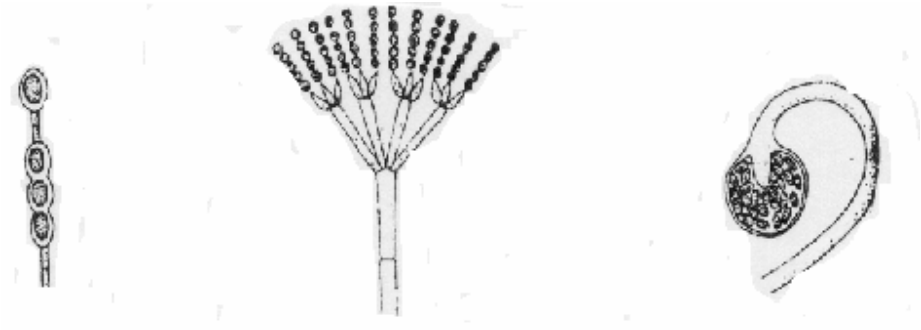
   b. Conidiosporas: Son esporas delgadas que se encuentran en grupos o solas

sobre hifas especializadas llamadas conidióforos. Algunos autores llaman conidiosporas a todas las esporas asexuales.

c. Esporangiosporas: Son esporas que se forman dentro de una estructura en forma de saco denominada esporangio. La hifa que porta el esporangio se denomina esporangióforo.

d. Astrosporas: Son esporas de paredes delgadas que se forman por fragmentación de las hifas.

e. Blastosporas: Son esporas que se forman por gemación.



Clamidosporas Conidiosporas Esporangiosporas

2. **Gemación**

Es el proceso de reproducción asexual que prevalece en las levaduras, aunque algunas especies se dividen por fisión.

3. **Fragmentación de hifas**

Los fragmentos de hifas son capaces también de dar nuevas colonias.

Reproducción sexual

Los hongos que tienen reproducción sexual la hacen a través de los siguientes pasos:

1. Un núcleo haploide de una célula donante (macho) penetra el citoplasma de una célula receptora (hembra).

2. Se fusionan los núcleos para formar un núcleo zigótico diploide.

3. Por meiosis el núcleo diploide origina cuatro núcleos haploides, algunos de los cuales pueden ser recombinantes genéticos.

De este proceso de reproducción sexual resultan las esporas sexuales, las cuales son usualmente más resistentes al calor que las esporas asexuales, pero sin llegar a tener la extremada resistencia al calor que presentan las endosporas bacterianas y presentan laten-

cia, es decir ellas sólo germinan cuando son activadas ya sea por un calentamiento suave o por ciertas sustancias químicas.

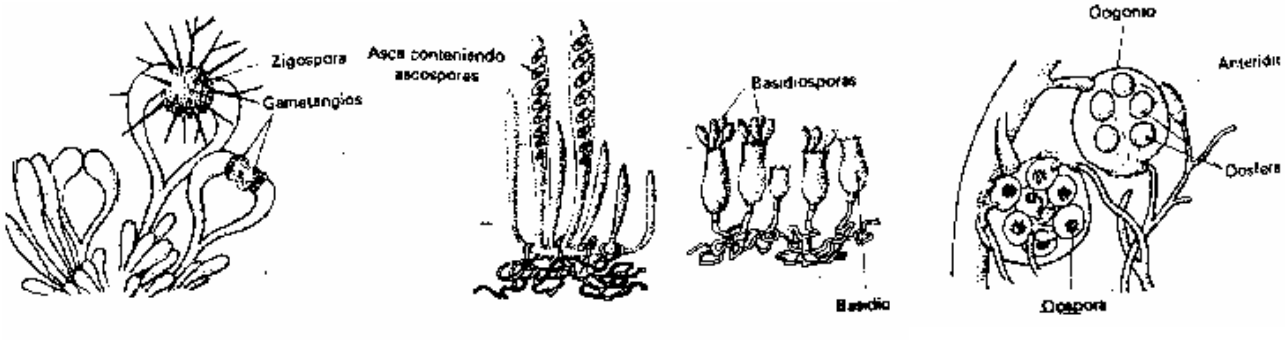
Existen varios tipos de esporas sexuales:

a. Zygosporas: Son esporas grandes de pared gruesa que resultan de la fusión de 2 gametos similares.

b. Ascosporas: Se producen en una estructura en forma de saco, llamada asca, después de la unión de 2 núcleos. Generalmente hay 8 ascosporas dentro de cada asca.

c. Basidiosporas: Resultan de la unión de 2 núcleos sobre una estructura especializada en forma de maza conocida como basidio. Generalmente hay 4 por basidio.

d. Oosporas: Estas se forman dentro de una estructura femenina denominada oogonio.



Esporas sexuales

CICLO DE MULTIPLICACIÓN VIRAL

En general el ciclo de multiplicación viral puede dividirse en una serie de fases, como son:

1. Adsorción de la partícula viral a la célula huésped.

2. Penetración del virus.

3. Liberación del ácido nucleico.

4. Replicación del ácido nucleico y síntesis de las proteínas que forman parte del virus.

5. Ensamblaje de las partículas virales.

6. Liberación de los virus maduros.

Adsorción de la partícula viral a la célula huésped

Existe una alta especificidad en la interacción del virus con su célula huésped. Este proceso de adsorción está mediado por receptores presentes tanto a nivel de la partícula viral como a nivel de la célula huésped. Entre los receptores de esta última tenemos: polisacáridos, lipoproteínas, glicoproteínas etc. En relación a los virus, la localización de los receptores depen-

de del tipo de virus; si se trata de un virus sin cubierta los receptores están localizados en la cápsida. En aquellos virus que poseen cubierta lipídica, los receptores están localizados en dicha cubierta.

El proceso de adsorción puede bloquearse añadiendo al medio anticuerpos dirigidos contra los receptores virales y en el caso de los virus que poseen cubierta, el proceso también puede impedirse tratándolos con solventes orgánicos.

Penetración del virus

Una vez que el virus ha hecho contacto con la célula huésped, la penetración depende del tipo de virus. Si se trata de virus sin cubierta, éstos son tomados por un proceso análogo a la fagocitosis, que en el caso de los virus se denomina "**viropexia**", donde la membrana celular sufre una invaginación y el virus penetra al interior como una vacuola fagocítica. En cambio que aquellos virus que poseen cubierta se fusionan con la membrana celular y lo que penetra es la nucleocápsida desnuda.

Liberación del ácido nucleico

Enzimas que normalmente están presentes en la célula huésped o que son inducidas por la presencia del virus, digieren la cápsida para liberar al ácido nucleico para que pueda ser transcrito y replicado.

Replicación del ácido nucleico y síntesis de las proteínas que forman parte del virus

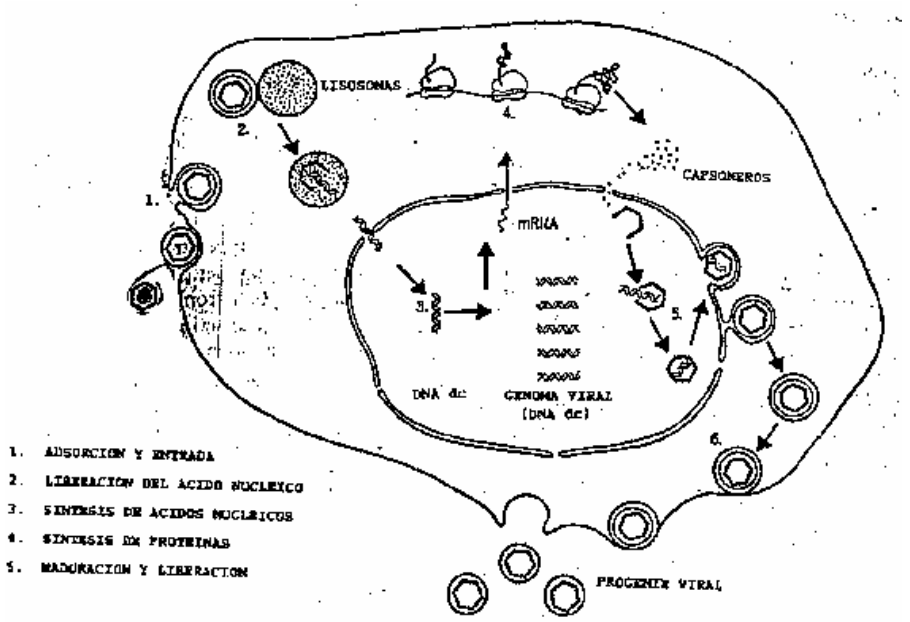
Existen diferentes mecanismos de replicación viral que dependen de la naturaleza del ácido nucleico. De una manera general podemos señalar los siguientes:

Virus cuyo genoma está constituído por ADN

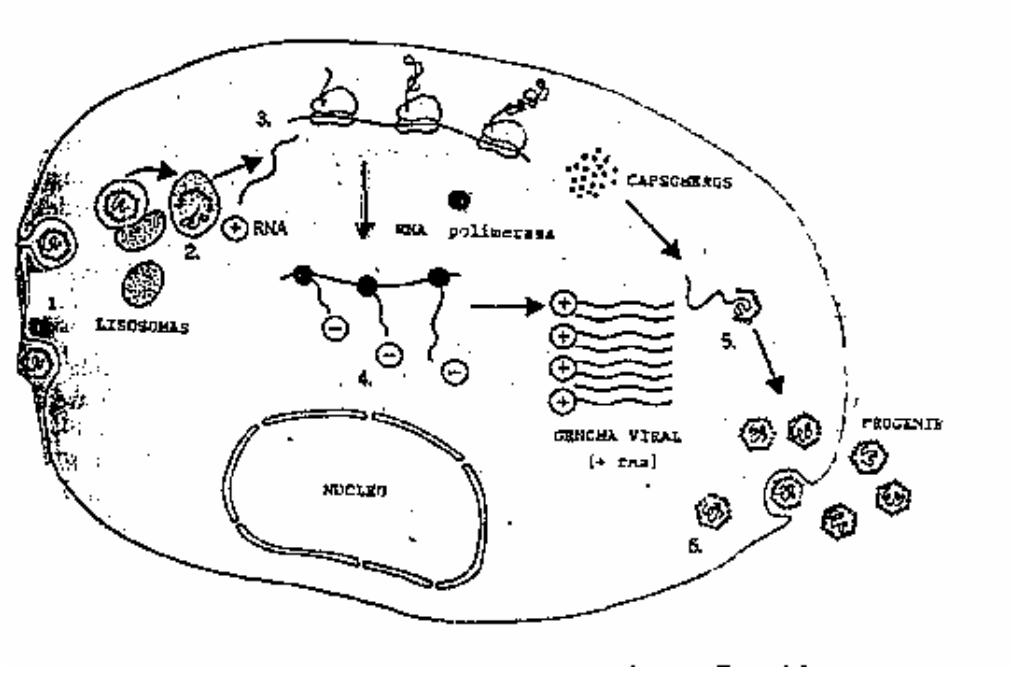
La mayoría de los ADN virus se replican en el núcleo, utilizando las enzimas de la célula huésped, la ADN polimerasa sintetiza el ADN viral y las proteínas virales tanto estructurales como funcionales serán transcritas a partir del genoma viral por la ARN-polimerasa ADN dependiente.

Virus cuyo genoma está constituído por ARN

La mayoría de los ARN virus se replican en el citoplasma, pero debido a que las células no replican ARN, es decir no sintetizan ARN usando como molde ARN, ellas no tienen las enzimas para realizar este proceso, de ahí que los ARN virus se valgan de diferentes estrategias para lograr hacer la replicación de su ARN, algunos ARN virus llevan la ARN transcriptasa en la partícula viral, otros tienen un genoma con polaridad mensajero que puede ser traducido directamente en los ribosomas y así sintetizar la ARN-transcriptasa requerida, y las otras proteínas funcionales y estructurales requeridas.



Ciclo de multiplicación de un ADN virus



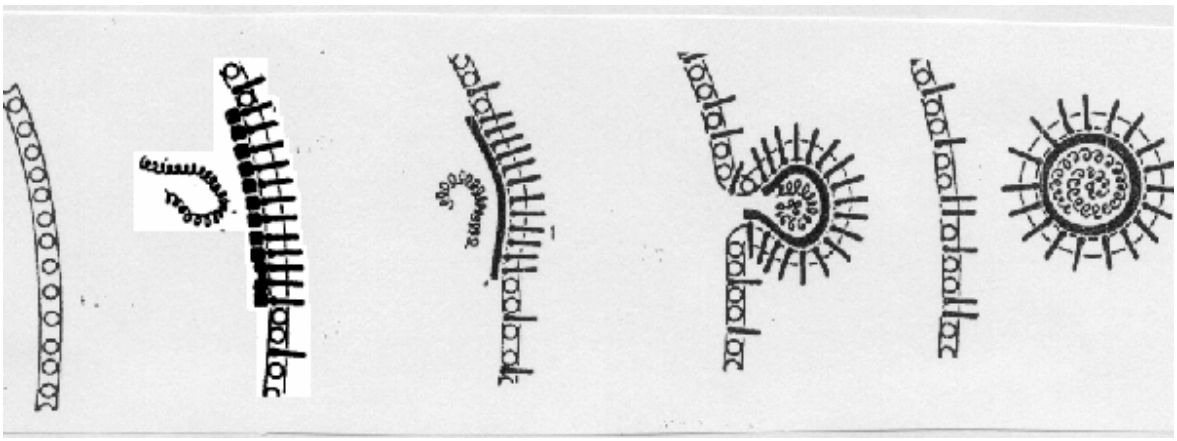
Ciclo de multiplicación de un ARN virus

Ensamblaje de las partículas virales

Una vez que se haya replicado el genoma y producido las proteínas que van a formar la cápsida, el próximo paso es el ensamblaje de los componentes para formar la nucleocápsida.

Liberación de la partícula viral

Esta última fase del ciclo de multiplicación viral, también depende del tipo de virus. Generalmente los virus sin cubierta producen la lisis de la célula huésped con la subsiguiente liberación de los virus. Por el contrario los virus que poseen cubierta, una vez formada la nucleocápsida, ésta se acerca a la membrana celular, la cual ha sido modificada por la incorporación de glicoproteínas codificadas por el virus. Finalmente la nucleocápsida adquiere la cubierta por un proceso semejante al de la gemación, que se ilustra a continuación.



Liberación de virus con cubierta

MÉTODOS PARA DETERMINAR LA INFECTIVIDAD DE UNA PREPARACIÓN VIRAL

Estos métodos se fundamentan en la capacidad que tienen los virus para multiplicarse dentro de la célula huésped con la subsiguiente liberación de partículas virales infecciosas que a su vez infectan nuevas células produciéndose así ciclos repetidos de multiplicación viral.

Métodos cuantitativos

Nos proporcionan el número de partículas infecciosas que existe en la preparación viral.

Recuento en placas

Un ejemplo de este tipo de método lo constituye la determinación del número de unidades formadoras de placas/mL de la preparación viral. Entiéndese por placa "una zona localizada de destrucción celular ocasionada por la multiplicación viral".

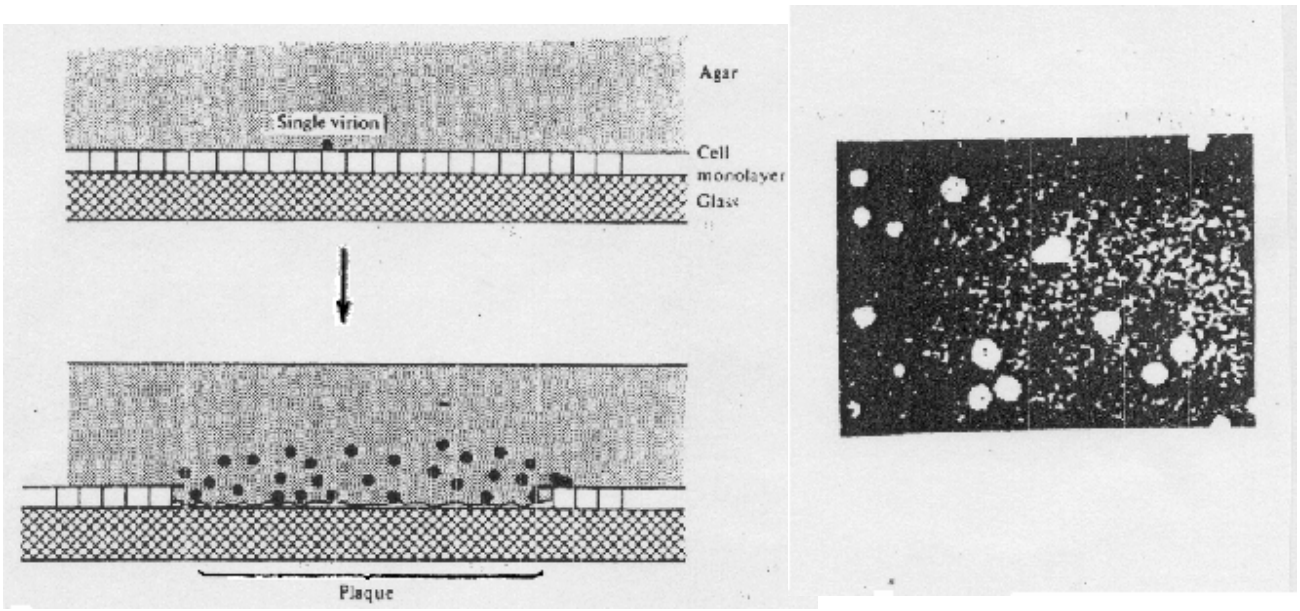
El método se basa en la infección de un gran número de monocapas de células susceptibles con alícuotas de diluciones de la preparación viral.

Dilución de la suspensión viral	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-10}
Volumen sembrado en cada placa	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
Monocapas de células susceptibles	○○○	○○○	○○○	○○○

Luego de que se haya sembrado el virus se deja transcurrir un tiempo dado con la finalidad de que se adsorban los virus a las células. Luego se cubren las monocapas con una capa de medio de cultivo solidificado con agar que previene la diseminación de la progenie viral. A bajas diluciones se observa la destrucción total del cultivo celular, pero a diluciones elevadas puede asumirse que cada placa o lesión es iniciada por la infección de una sola partícula viral infecciosa. Con los virus que matan a las células, la lesión puede observarse con ayuda de luz transmitida; utilizando colorantes vitales puede aumentarse su contraste, por ejemplo Rojo neutro que es tomado únicamente por las células vivas.

Dilución	10^{-4}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-10}
Placa 1	INCONTABLE	INCONTABLE	235	3
Placa 2	INCONTABLE	INCONTABLE	265	2
Placa 3	INCONTABLE	INCONTABLE	254	1

Número de unidades formadoras de placas/mL de la suspensión viral = $\frac{251{,}33 \text{ UFP}}{0{,}2 \text{ mL}} \times 10^{8} = 1{,}25 \times 10^{11}$ UFP/mL.



Formación de una placa

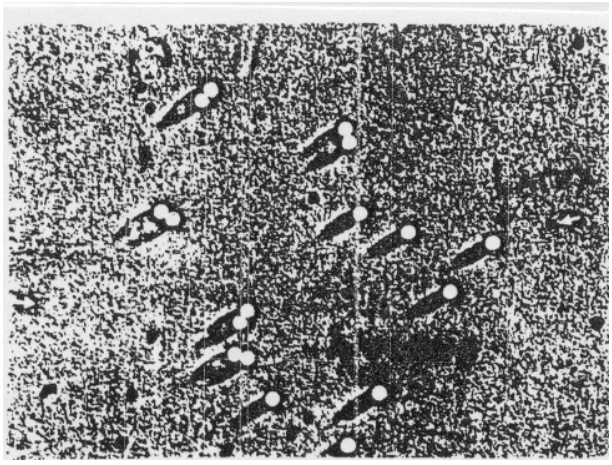
Algunos virus no matan a las células que infectan, por lo tanto hay que recurrir a otros métodos para poner en evidencia la multiplicación viral localizada, por ejemplo anticuerpos fluorescentes.

Métodos para determinar el número de partículas virales totales

Estas técnicas no discriminan entre partículas infecciosas y no infecciosas. El más utilizado es el método de recuento al microscopio electrónico.

Recuento al microscopio electrónico

Los virus pueden contarse al microscopio electrónico. Como no es posible determinar exactamente el volumen de la preparación viral para ser observada al microscopio electrónico se usa como referencia una suspensión de partículas de látex de concentración conocida. Se procesa para su observación al microscopio electrónico y se cuenta el número de partículas virales y el número de partículas de látex. Como se conoce la concentración de partículas de látex, fácilmente puede calcularse el número de partículas virales totales.



Recuento de partículas totales al microscopio electrónico

BIBLIOGRAFÍA

Davis, Dulbecco, Eisen and Ginsberg. 1990. Microbiology. Fourth Edition. J. B. Lippincott Company.

Madigan M.T, Martingo J. M. y Jack Parker. 2004. Décima Edición. Brock Biología de los Microorganismos Prentice Hall

Prescott, L.; Harley, J.; Klein D. 1999. Microbiología. Cuarta edición. McGraw-Hill Interamericana.

Tortora G. J., B. R. Funke and Ch. L. Case 2007. Introducción a la Microbiología 9na Edición. Editorial Médica Panamericana.

Wistreich and Lechtman. Microbiology. Fifth Edition. 1998. Macmillan Publishing. Co.

Magaly Pedrique de Aulacio
Norma De Castro
Cátedra de Microbiología - Facultad de Farmacia
UCV
Noviembre 2001
Revisión 2008

ACTIVIDADES ADICIONALES

1. En la determinación del número de bacterias viables de una muestra de leche se obtiene el siguiente resultado:

	Placa			
Dilución	1	2	3	Volumen sembrado
10^{-2}	Incontable	Incontable	Incontable	1 mL
10^{-3}	174	159	168	1 mL
10^{-4}	18	25	29	1 mL
10^{-5}	1	3	2	1 mL

   Determinar cuántas bacterias hay por mL de leche

2. Explique resumidamente cómo determinaría usted el número de bacterias presentes en una muestra de orina.

3. Se tomó una muestra de agua y se le hizo un recuento usando la cámara de Petroff-Hausser y se obtuvo un resultado de 10^{12} bacterias/mL, simultáneamente se le hizo un recuento en placas a la misma muestra de agua, dando éste un resultado de 5 x 10^5 ufc/mL. Explique resumidamente las posibles razones de la discrepancia entre los resultados.

4. Busca en un diccionario de inglés técnico la traducción al español de las palabras siguientes

Binary fission	
Cell division	
Colony count	
Dead phase	
Direct count	
Elementary body	
Generation time	
Growth	
Growth rate	
Hemocitometer	
Inoculum	
Latency	
Latency phase	
Log phase	
Milk	
Sample	
Square	
Tissue culture	
Total crop	
Turbidity	