

Crecimiento microbiano

Bibliografía:

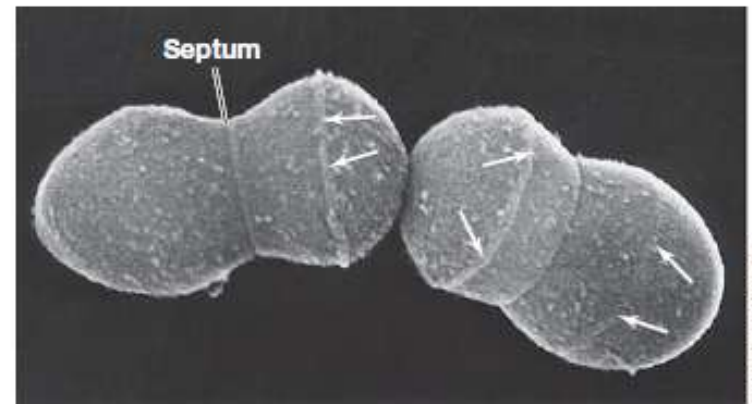
- Brock. Biología de los Microorganismos. Madigan – Martinko – Dunlap - Clark (12a. ed, 2009 y posteriores) Editorial Pearson
- The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes by David White, James Drummond and Clay Fuqua (4a. Ed, 2011). Cap. 4

INTRODUCCIÓN AL CRECIMIENTO MICROBIANO

Incremento ordenado de todos los componentes celulares, que conduce a un aumento de masa y finalmente a un aumento del número de células

Para que el crecimiento bacteriano tenga lugar es necesario un aporte adecuado de nutrientes. Todos los microorganismos necesitan carbono, nitrógeno, hidrógeno, oxígeno, azufre, fósforo y diversos minerales para crecer. Muchos necesitan también nutrientes especiales. Los microorganismos captan estos nutrientes mediante diversos mecanismos de transporte a través de las membrana.

En Microbiología el crecimiento se relaciona con el aumento del número de individuos



I. CRECIMIENTO INDIVIDUAL: CICLO CELULAR

Secuencia de acontecimientos identificables que ocurren desde que surge una nueva célula hasta que ésta se divide en dos hijas

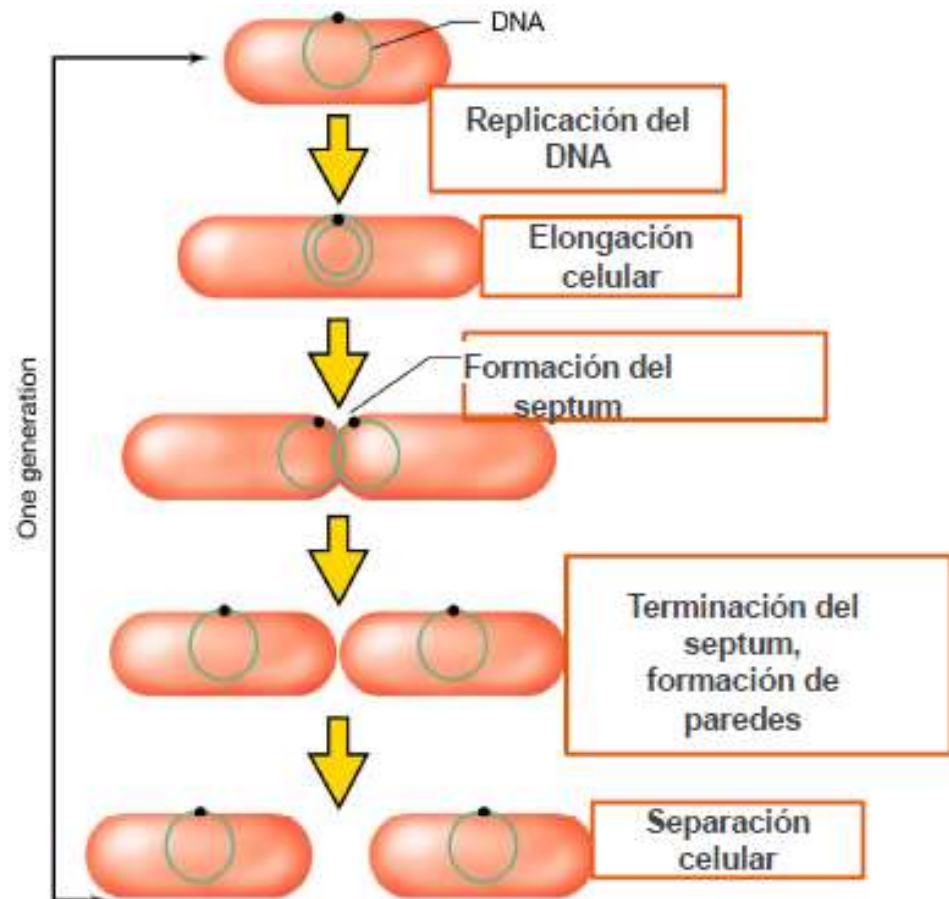
En el ciclo existen diferentes períodos:

- Replicación del ADN cromosómico
- Formación del septo y división celular

Fisión binaria

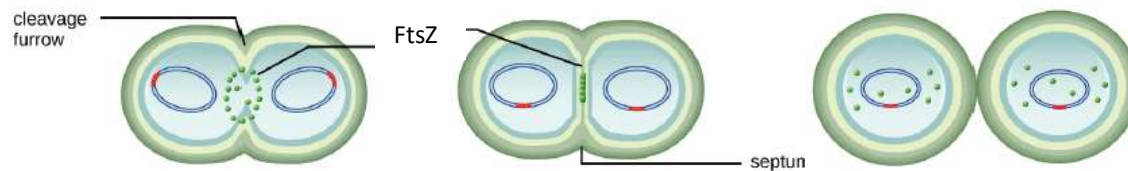
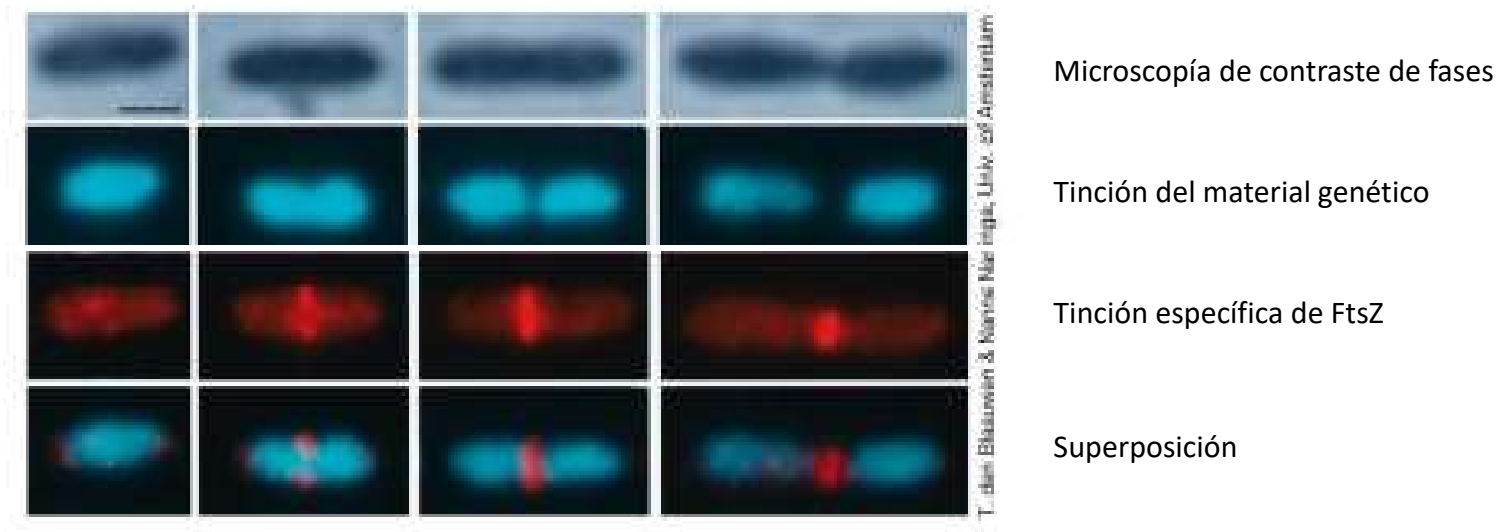
La célula duplica su tamaño y luego se produce la división celular

Tiempo de generación: el tiempo requerido para que las células microbianas dupliquen su número



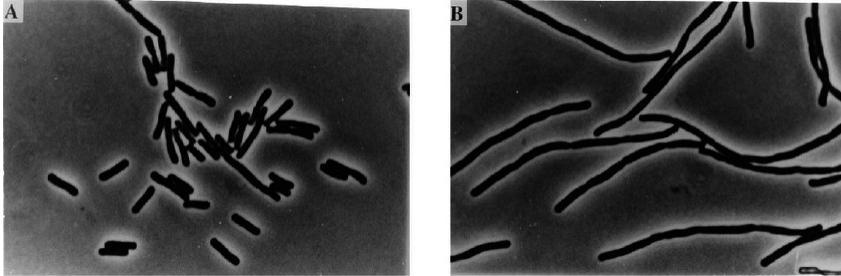
FORMACIÓN DEL SEPTUM

Para que la división celular tenga lugar se debe formar un tabique o septo que separe la célula original en dos células hijas (fisión binaria). Cada una de ellas recibe un cromosoma completo y la porción correspondiente de citoplasma.



FORMACIÓN DEL SEPTUM

En la formación del septo intervienen las **proteínas Fts** (Filamentous temperature sensitive), que forman el aparato de división de la célula o **divisoma**.



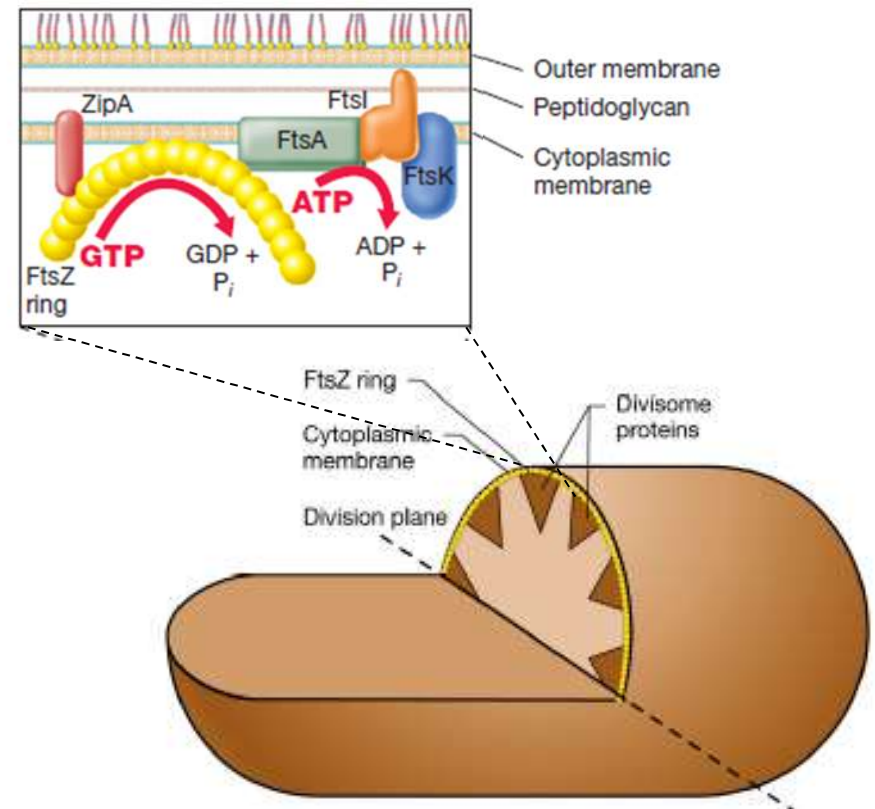
FtsZ: similar a la tubulina de eucariotas, con actividad GTPasa. Forma un anillo y recluta las otras proteínas del divisoma. Citoplasmática.

ZipA: ancla que conecta el anillo de FtsZ a la membrana citoplasmática.

FtsI: PBP (proteína de unión a penicilina)

FtsA: ayuda a conectar el anillo de FtsZ a la membrana y recluta otras proteínas del divisoma

FtsK: media la separación de los cromosomas a las células hijas



El divisoma dirige el crecimiento de la membrana plasmática y de la pared en el **centro** de la célula y luego ocurre una constricción para formar dos células hijas

Por qué el divisoma se forma en el centro de la célula?

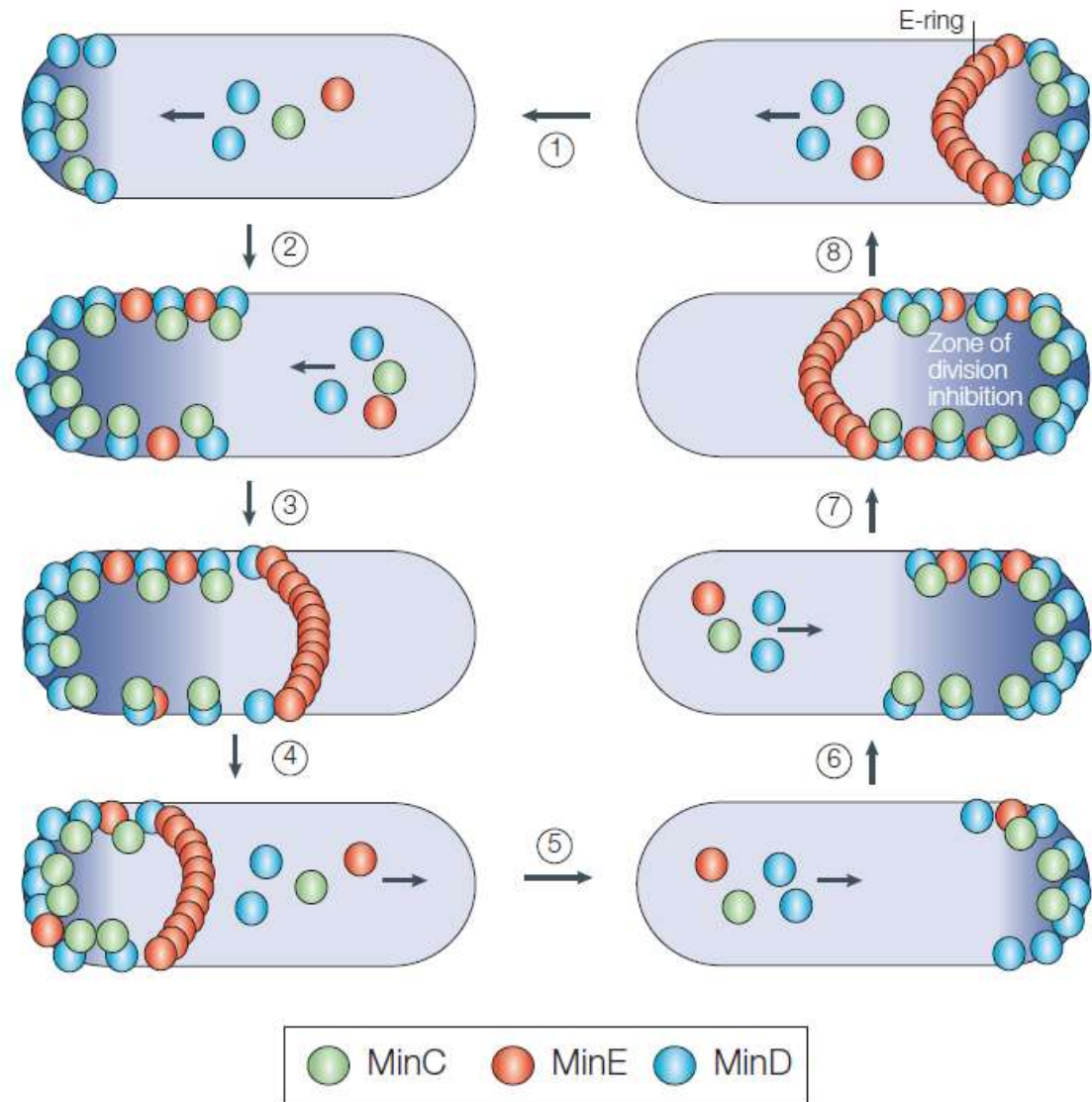
Sistema **MinCDE** (*E. coli*)

MinC: interacciona con FtsZ e impide la formación de anillos estables.

Se forma una hélice formada por proteínas **MinCD**, desde un polo hacia el centro de la célula.

Al interactuar con un anillo de **MinE** la hélice se desensambla y comienza a formarse en el polo opuesto de la célula.

Debido a la rápida oscilación, se genera una zona de inhibición de la división cerca de ambos polos de la célula



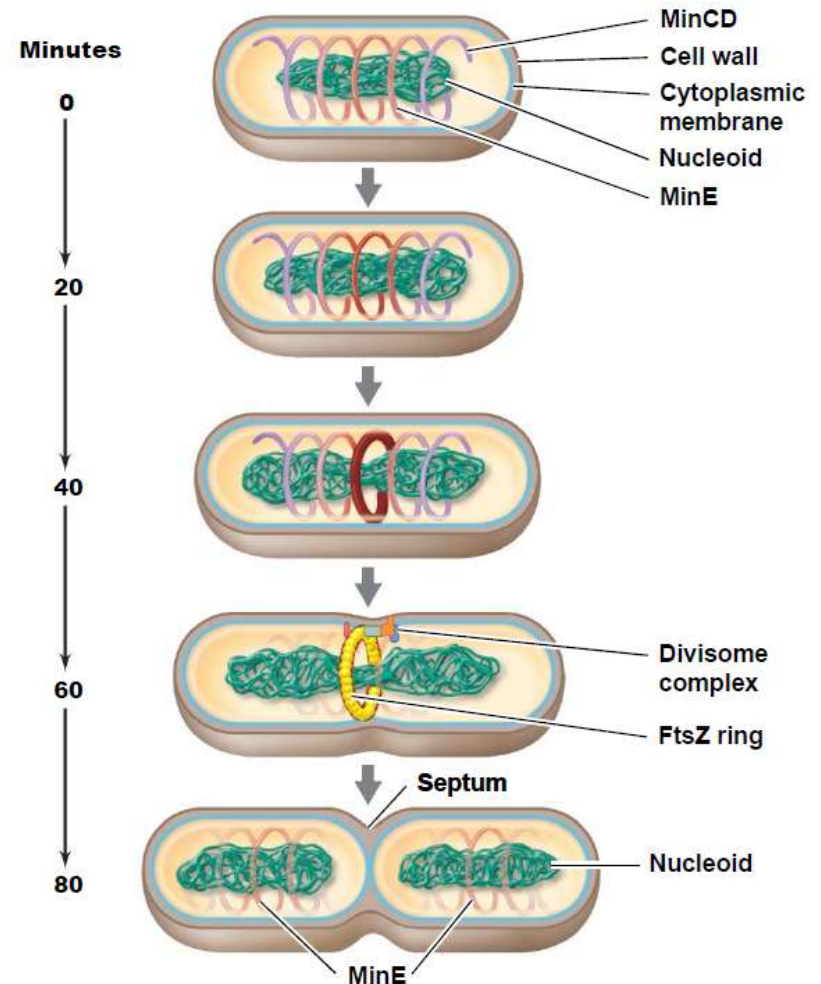
Por qué el divisoma se forma en el centro de la célula?

La duplicación del cromosoma tiene lugar antes de la formación del anillo FtsZ.

Proteínas de unión específica a ADN se unen al cromosoma, bloqueando la formación del anillo cerca del material genético, para asegurar una división correcta sin daño cromosómico. Este mecanismo de control se denomina “exclusión del nucleoide”, impide el ensamblaje de la maquinaria de división celular (anillo Z-FtsZ) sobre el ADN.

Las proteínas **Min** forman una estructura espiral localizada en la superficie de la membrana plasmática, que oscila moviéndose de un polo a otro. **MinC** y **MinD** inhiben la formación del anillo FtsZ. **MinE** también oscila de polo a polo, empujando a MinCD.

El anillo FtsZ aparece entre los nucleoides duplicados. **FtsK** y otras proteínas ayudan a que los nucleoides se separen a medida que se va produciendo la elongación celular. Cuando se produce la constricción el anillo FtsZ se despolimeriza y se forma el tabique.



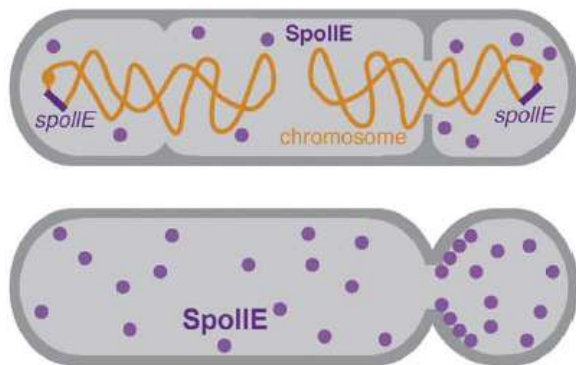
En la esporulación se forma un septum asimétrico

La división celular asimétrica ocurre tras la formación transiente de **espirales de FtsZ**, que distribuyen estas moléculas a ambos polos de la célula.

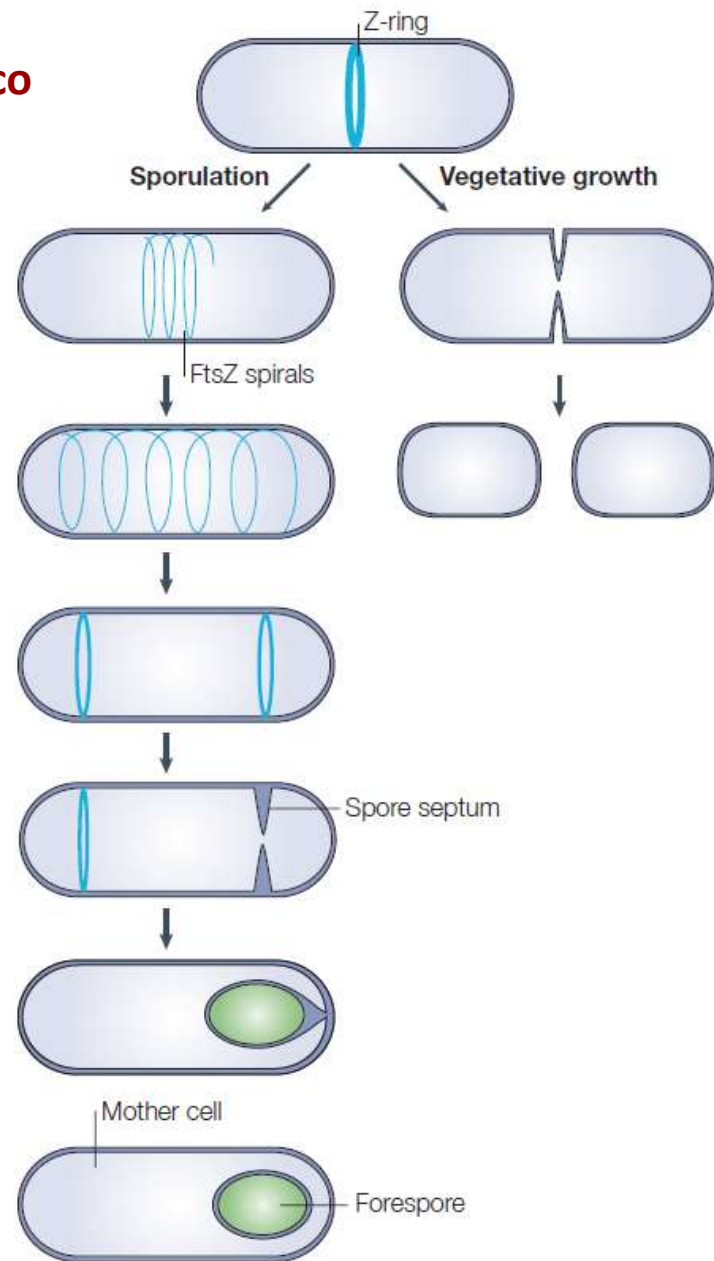
Se forma un anillo de FtsZ en cada polo.
Sólo uno de estos anillos forma un septum.

La asimetría se refuerza por una vía de señalización que controla la expresión de genes específica de cada compartimento.

La concentración de SpoIIIE es mayor en la espora luego de la septación. Activa un factor sigma (σ^F) que dirige la expresión de genes específicos de la espora.



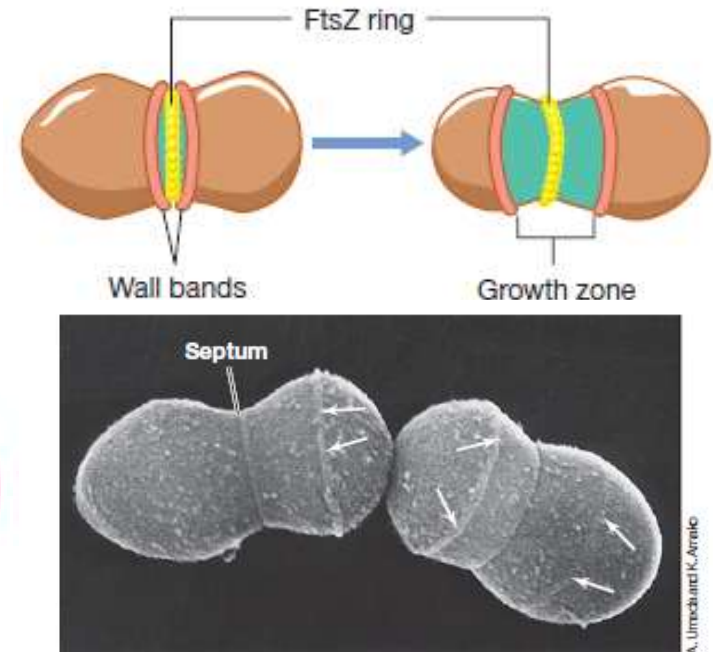
Current Opinion in Cell Biology



SÍNTESIS DE PEPTIDOGLICANO Y DIVISIÓN CELULAR

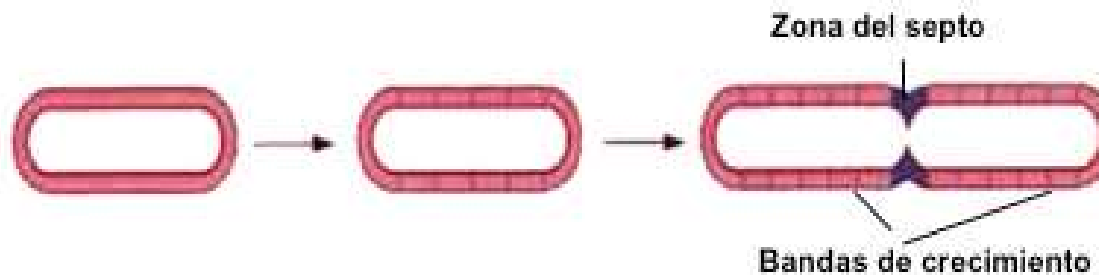
Patrón de crecimiento en cocos

La síntesis de nuevo peptidoglicano ocurre en direcciones opuestas hacia afuera del anillo FtsZ. Se forman bandas de pared (unión entre peptidoglicano nuevo y el antiguo)



Patrón de crecimiento en bacilos

En bacilos el crecimiento ocurre en distintos puntos a lo largo de la célula



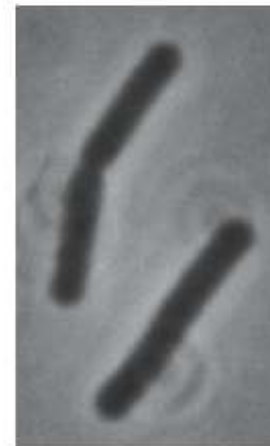
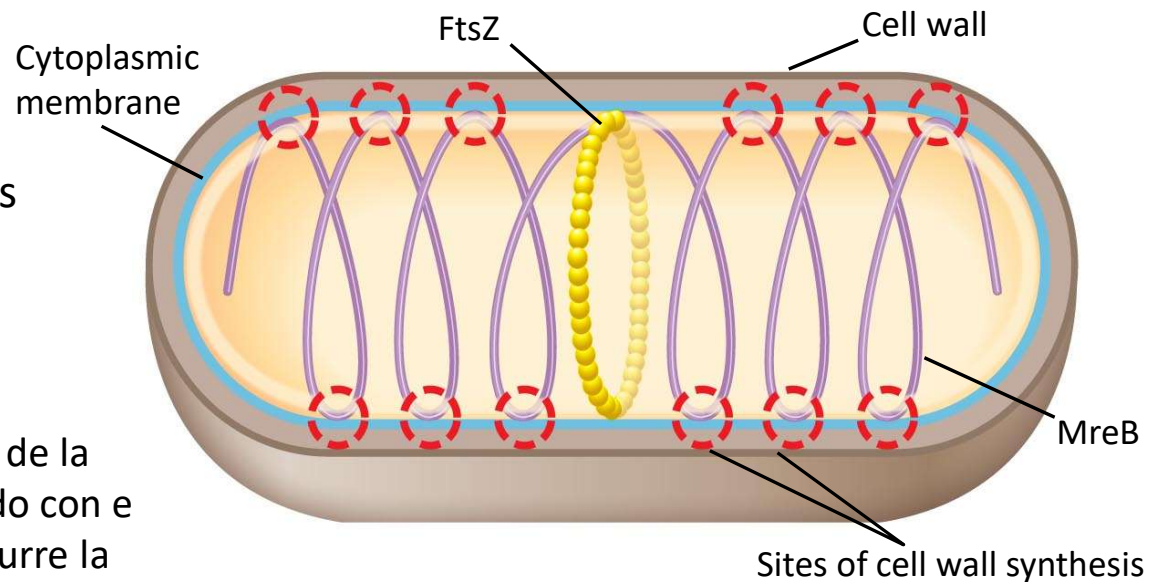
DETERMINACIÓN DE LA FORMA CELULAR: PROTEÍNA MreB

MreB determina la forma en procariontes formando un citoesqueleto que recluta otras proteínas que dirigen el crecimiento de la pared en patrones específicos.

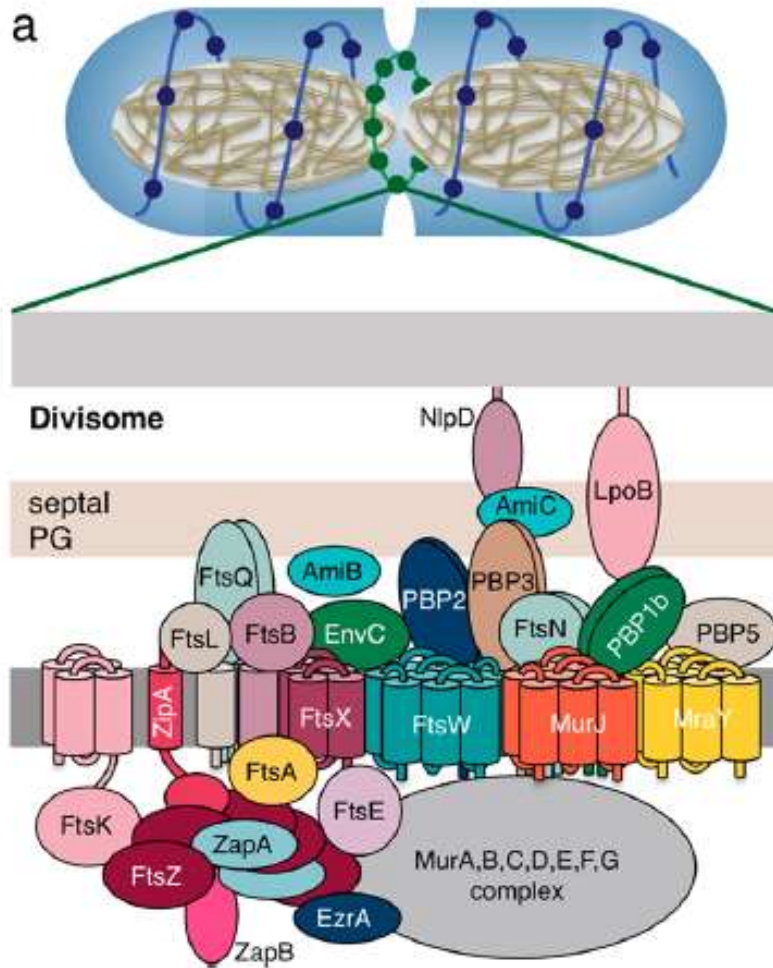
MreB forma un espiral por debajo de la membrana plasmática, contactando con e en varios puntos. En esos sitios ocurre la síntesis de nuevo peptidoglicano.

Se rellenan agujeros dejados por acción de autolisinas, que rompen enlaces glicosídicos y amida (por ej.: D-D carboxipeptidasas, D-D endopeptidasas, amidasas, transglicosilasas líticas)

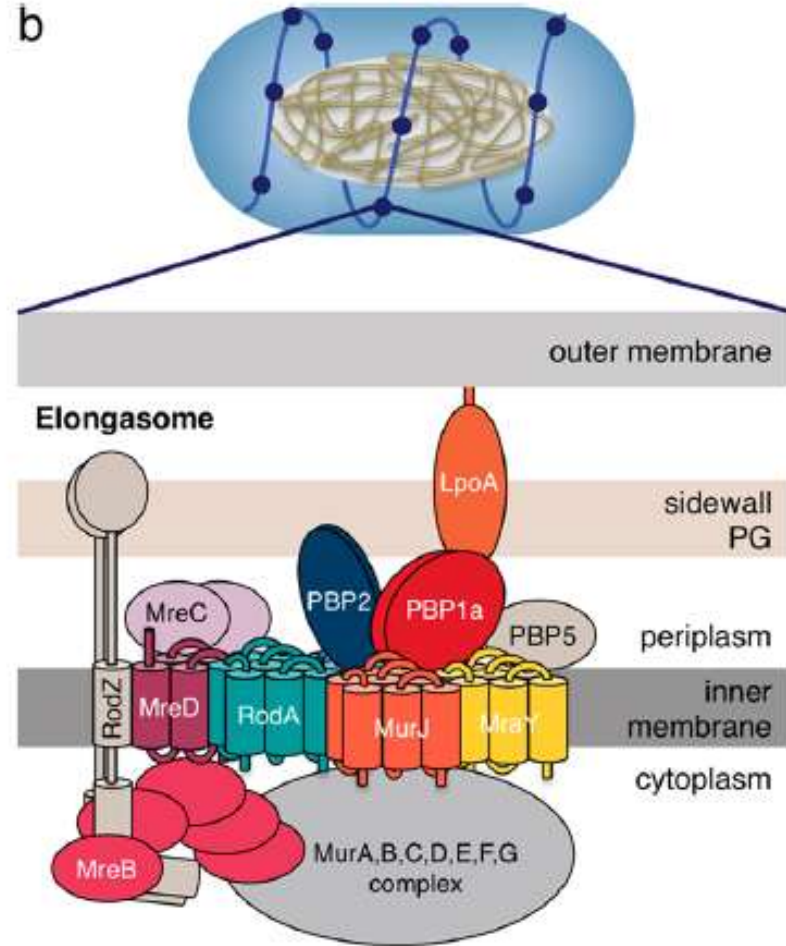
MreB no está presente en cocos. La inactivación del gen que codifica para MreB en bacilos convierte esas células en cocos



La mayoría de los genomas de arqueas contienen proteínas FtsZ y MreB-like



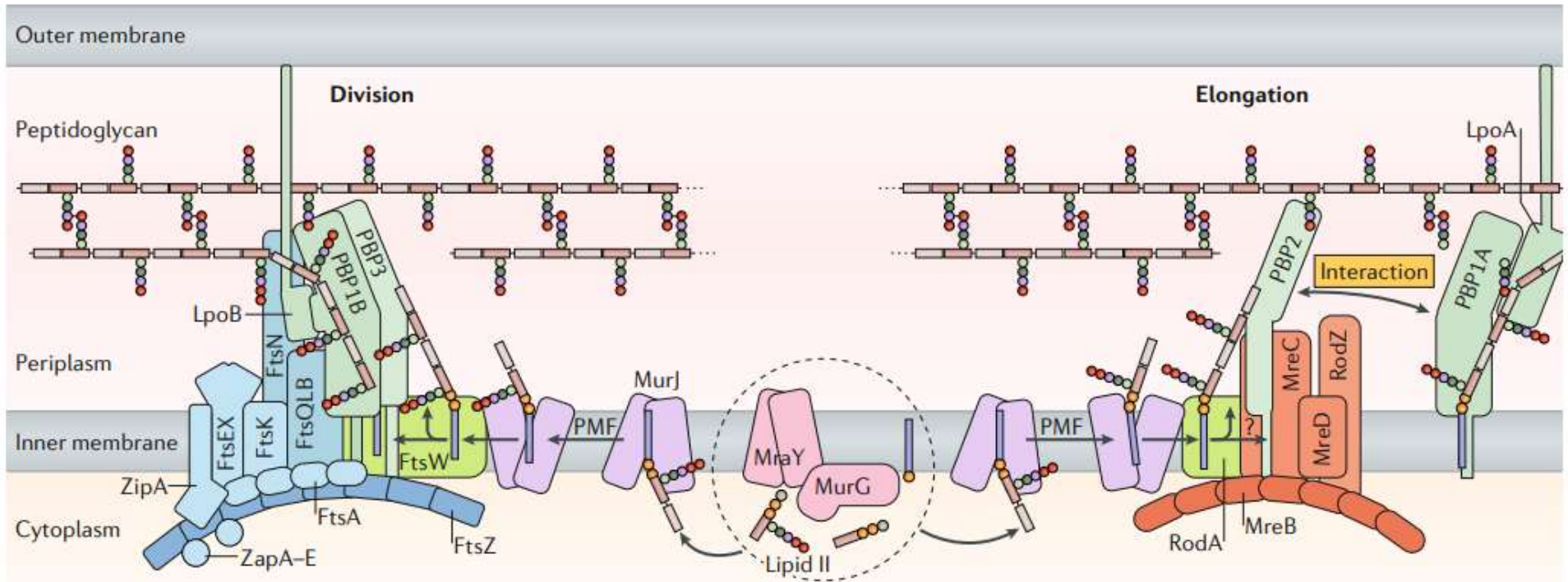
El complejo proteico del divisoma (en verde) se forma en el centro de la célula y facilita la septación



El elongasoma (en azul) se forma en las bandas laterales, favoreciendo su expansión

Dick et al. 2018

Flipping del lípido II y síntesis de peptidoglicano durante la elongación y la división celular



MraY y **MurG** producen **lípido II** en la membrana interna y co-localizan con los complejos de división y elongación en *E. coli*. La flipasa **MurJ** requiere la fuerza protón-motriz (PMF) para impulsar los cambios conformacionales en su mecanismo de transporte. La co-localización de MurJ con el divisoma requiere una **FtsW** activa. La evidencia *in vitro* sugiere que **FtsW** y **PBP3** regulan el acceso de **PBP1B** al lípido II

MraY, fosfo-N-acetilmuramoil-pentapéptido transferasa; MurG, undecaprenildifosfo-muramoilpentapéptido beta-N-acetilglucosaminiltransferasa; MurJ, transportador MOP (multidroga, oligosacárido-lípido, polisacárido) (flipasa del lípido II). PBP1a y b, glicosiltransferasas y transpeptidasas; PBP2 y PBP3, transpeptidasas.

II. CRECIMIENTO DE POBLACIONES BACTERIANAS

El crecimiento de una población bacteriana está definido por el aumento de la masa bacteriana o del número de individuos

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO. Cambio en la masa celular o en el número de células experimentado por unidad de tiempo

TIEMPO DE GENERACIÓN (g). Tiempo requerido para que la población se duplique. Durante cada generación se duplican la masa y el número de células. Es un parámetro variable para los diferentes microorganismos

Si el tiempo de generación es **constante**, el número de células de la población bacteriana **se duplica en un período fijo**. Se conoce como crecimiento balanceado, crecimiento logarítmico o **crecimiento exponencial**.

Para que esto ocurra el cultivo bacteriano debe crecer en un medio adecuado, sin limitación de nutrientes y sin productos tóxicos de desecho.

ASPECTOS CUANTITATIVOS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

Number of generations (n)	Number of cells	Each division adds two new cells
0	1	
1	2	
2	4	
3	8	

El aumento del número de células es una **progresión geométrica de base dos**

N° células =

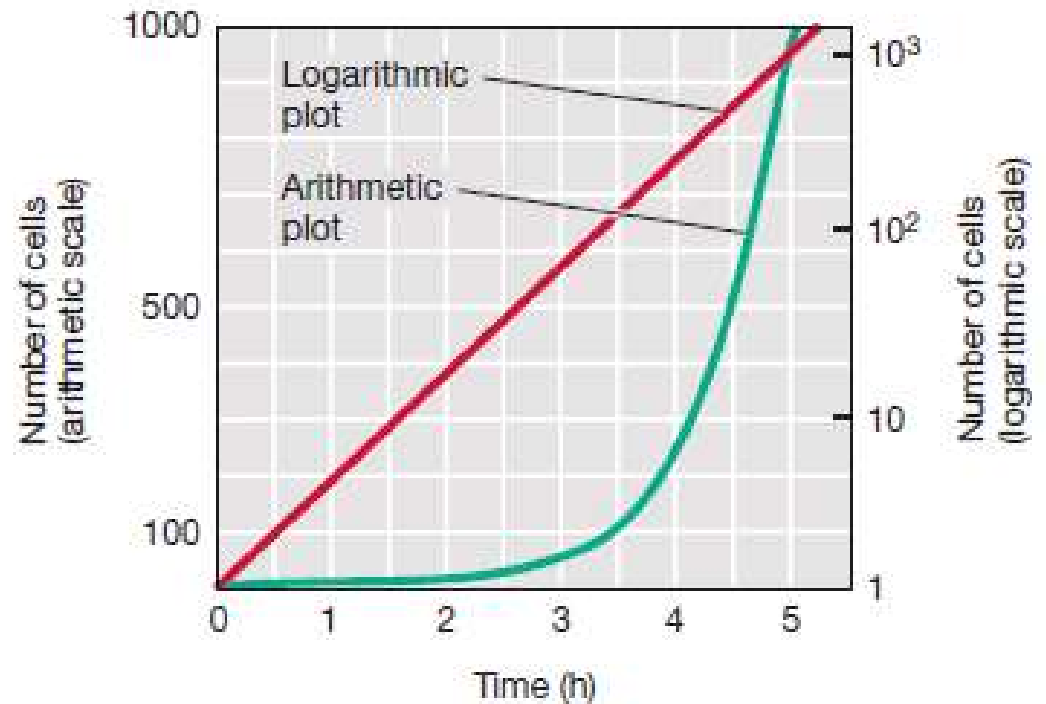
$$2^n$$

n = número de generaciones

CRECIMIENTO EXPONENCIAL

Time (h)	Total number of cells
0	1
0.5	2
1	4
1.5	8
2	16
2.5	32
3	64
3.5	128
4	256 (2^8)
4.5	512 (2^9)
5	1,024 (2^{10})
5.5	2,048 (2^{11})
6	4,096 (2^{12})
.	.
.	.
10	1,048,576 (2^{19})

g = 30 min



La representación de este crecimiento en escala **aritmética** es una curva cuya pendiente aumenta constantemente.

Si se representa en escala **semilogarítmica** se obtiene una recta.

EXPRESIÓN MATEMÁTICA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

En una población de bacterias que se encuentre en crecimiento equilibrado (medio adecuado, parámetros nutricionales y ambientales constantes) todos los constituyentes aumentan de manera proporcional en la unidad de tiempo

Velocidad de aumento de células = μ . N° o masa de células

constante de proporcionalidad

μ : velocidad específica de crecimiento

En términos matemáticos la velocidad de crecimiento de cualquier componente en un tiempo corto puede expresarse

$$\frac{dZ}{dt} = \mu \cdot Z$$

EXPRESIÓN MATEMÁTICA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

Considerando el número de células N

$$\frac{dN}{dt} = \mu \cdot N$$

Agrupando

$$\frac{dN}{N} = \mu \cdot dt$$

Integrando

$$\int \frac{dN}{N} = \int \mu \cdot dt$$

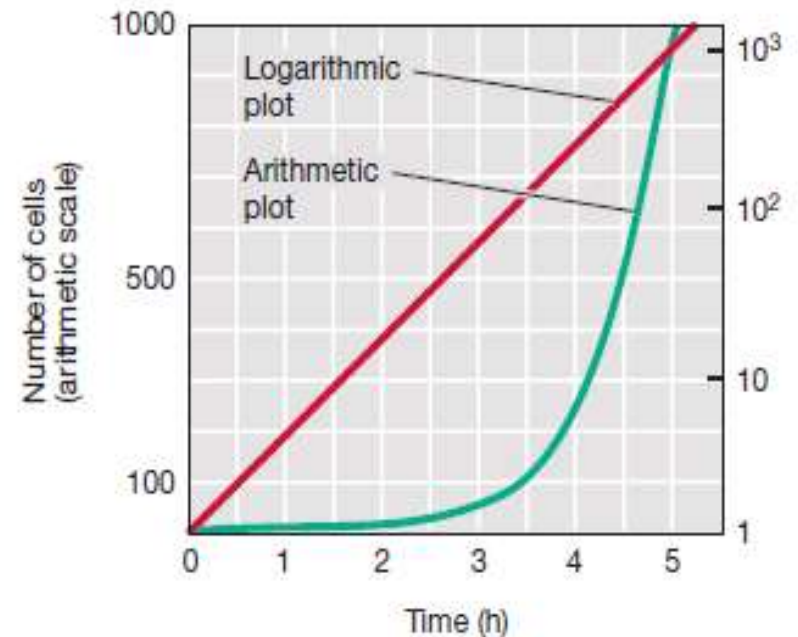
$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu \cdot (t - t_0)$$

$$\ln N - \ln N_0 = \mu \cdot (t - t_0)$$

$$\ln N = \ln N_0 + \mu \cdot (t - t_0)$$

Forma exponencial

$$N = N_0 e^{\mu \cdot (t - t_0)}$$



$$\log N = \log N_0 + \frac{\mu \cdot (t - t_0)}{2.303}$$

$$N = N_0 10^{\frac{\mu \cdot (t - t_0)}{2.303}}$$

EXPRESIÓN MATEMÁTICA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

CÁLCULO DEL TIEMPO DE GENERACIÓN

Tiempo de generación o de duplicación (g): tiempo requerido para que los componentes del cultivo se incrementen en un factor de dos

Si la velocidad específica de crecimiento es constante

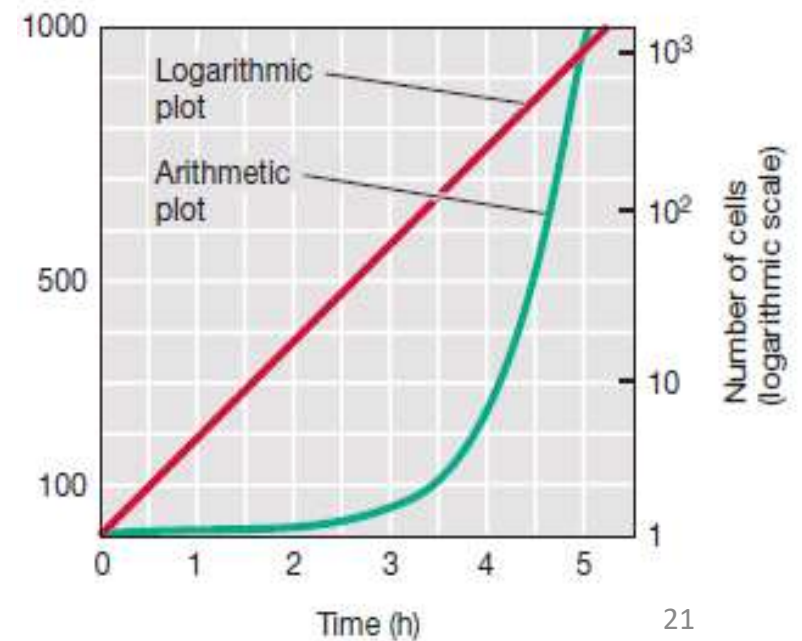
$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu \cdot (t - t_0) \quad \text{y} \quad N = 2 N_0$$

$$\ln \frac{2N_0}{N_0} = \mu \cdot (t - t_0) = \mu \cdot g$$

$$\ln 2 = \mu \cdot g$$

$$g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$$\mu = \frac{\ln 2}{g}$$



MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

MEDIDA DEL CRECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN

El crecimiento de una población microbiana se puede medir estimando el incremento de masa celular o el aumento del número de células. En ambos casos se pueden emplear **métodos directos o indirectos**.

Los más utilizados son:

Métodos de medida de la MASA CELULAR

- Determinación del peso seco (directo)
- Métodos turbidimétricos (indirectos)

Métodos de medida del NÚMERO DE CÉLULAS (directos)

- Recuento en cámara de Petroff-Hausser
- Recuento con contador de Coulter
- Recuento en placa
- Recuento sobre filtros de membrana

MEDIDA DEL CRECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN

MÉTODOS DE MEDIDA DE LA MASA CELULAR

Determinación del peso seco: las células de un cultivo se recogen por centrifugación de un volumen determinado, se lavan, se secan y se pesan.

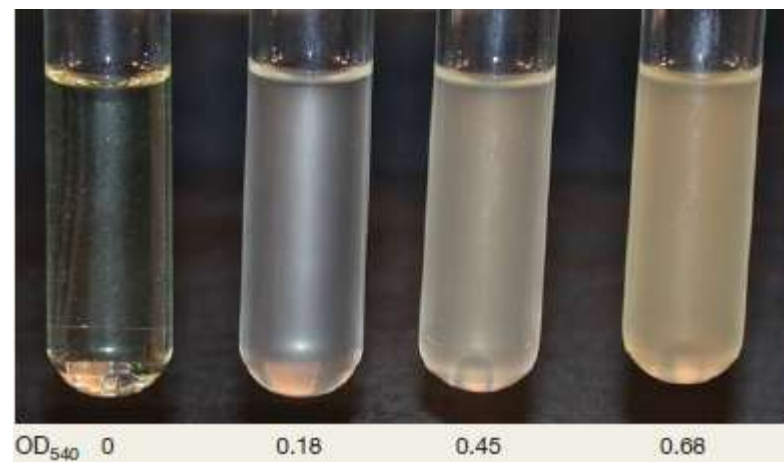
Laborioso y poco sensible.

También puede hacerse determinación del peso húmedo o de algún componente celular: ADN, proteínas, etc.

células totales: vivas y muertas

Métodos turbidimétricos: se basan en la capacidad de las células para dispersar la luz que incide sobre ellas.

El grado de dispersión es proporcional a la biomasa presente

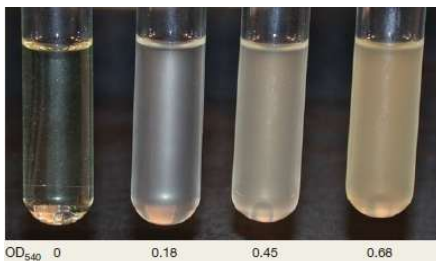
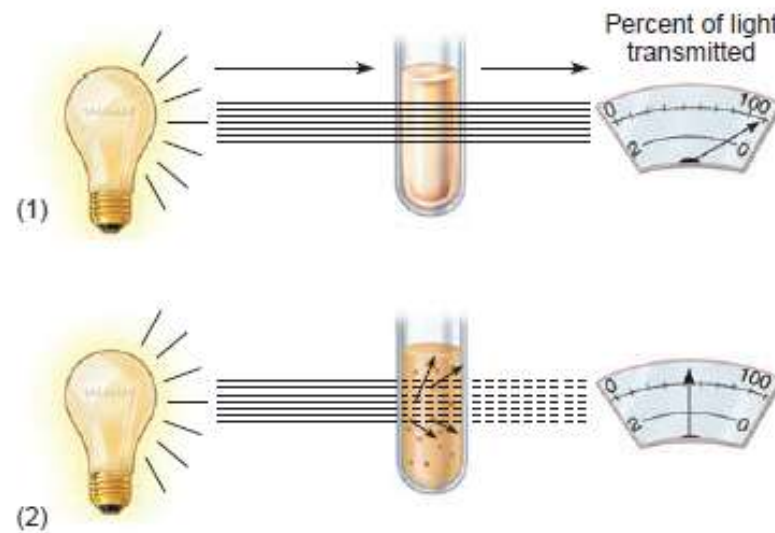


MÉTODOS DE MEDIDA DE LA MASA CELULAR

Turbidez: disminución de la luz transmitida a través del tubo (Transmitancia), lo que equivale a mayor cantidad de luz absorbida (Absorbancia)

En un espectrofotómetro las lecturas se expresan en unidades de densidad óptica (DO)

También se puede medir turbidez por comparación con escalas prefabricadas (escala de Mac Farland)



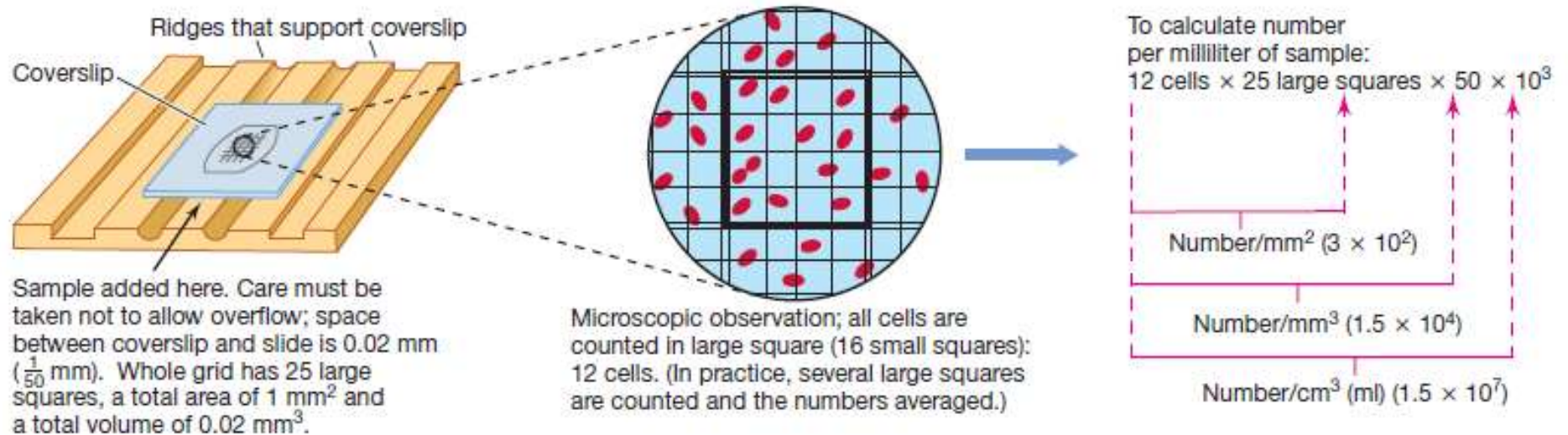
células totales: vivas y muertas

MÉTODOS DE MEDIDA DEL NÚMERO DE CÉLULAS

RECUENTO EN CÁMARA DE PETROFF-HAUSSER

Son portaobjetos excavados modificados sobre cuya superficie está marcada una rejilla con pequeños cuadros de área conocida.

En esta cámara la excavación mide 0.02 mm de profundidad (1/50 mm) y está dividida en 25 cuadros grandes, subdivididos a su vez en 16 pequeños (400 celdillas en 1 mm²)



células totales: vivas y muertas

MÉTODOS DE MEDIDA DEL NÚMERO DE CÉLULAS

RECuento EN CONTADOR COULTER

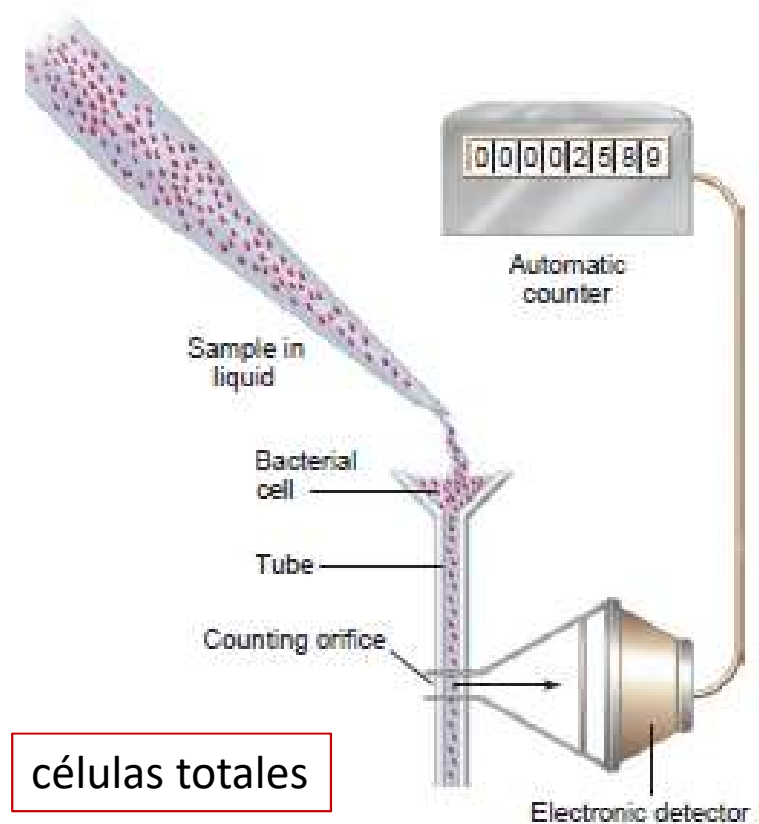
Permite la automatización del recuento de células.

Una solución electrolítica fluye a través de una delgada pipeta arrastrando las células en suspensión que, al tratarse de **partículas muy poco conductoras**, producen un **aumento en la resistencia** del líquido al atravesar el microcanal.

Como consecuencia, la corriente eléctrica que atraviesa el canal disminuye por un breve período. El contador detecta estos **cambios en la corriente eléctrica**.

Al llevar un registro de los **pulsos** que ocurren en la corriente eléctrica, se puede contar el **número de partículas** presentes en un determinado volumen de fluido.

La **amplitud del cambio** en la corriente que atraviesa el microcanal se encuentra directamente relacionado al **volumen** de la partícula, permitiendo medir también la distribución del tamaño de las partículas contadas.



MÉTODOS DE MEDIDA DEL NÚMERO DE CÉLULAS

RECUENTO EN PLACA

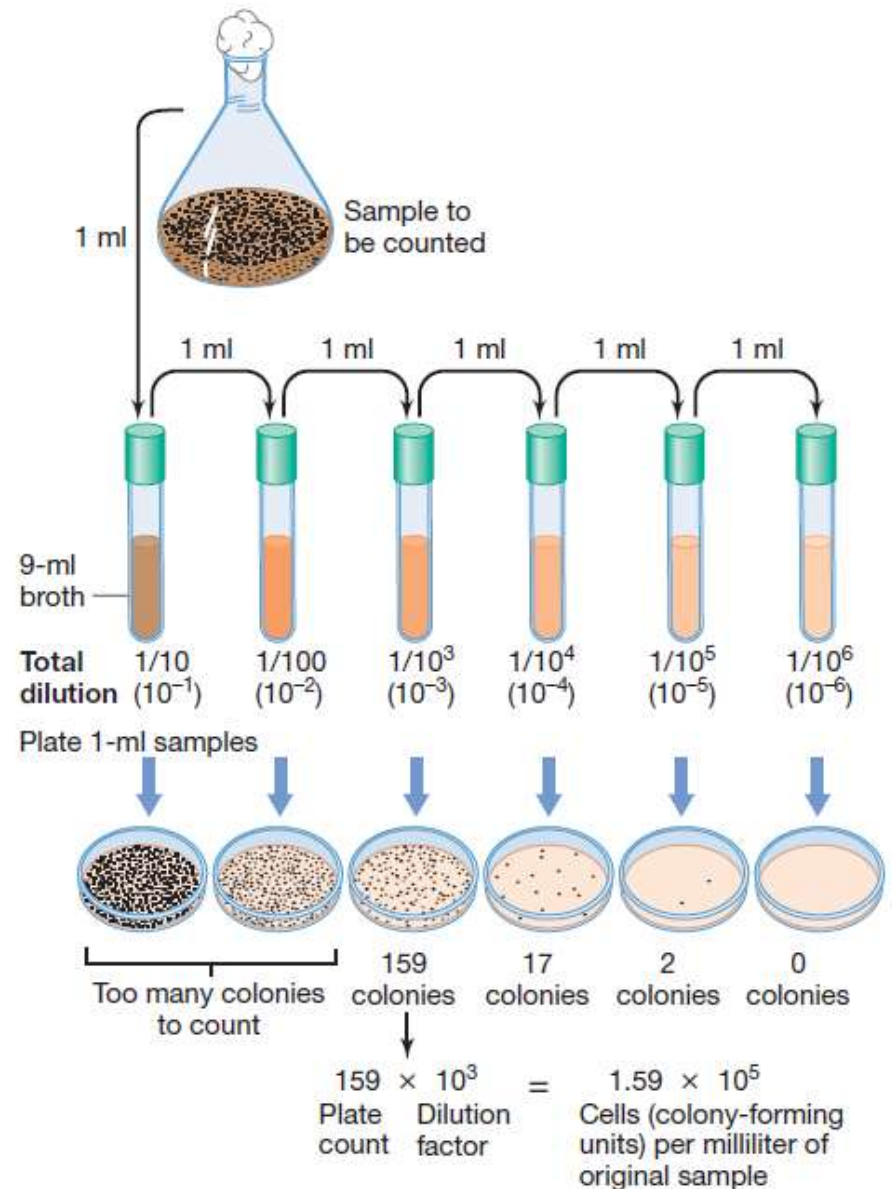
Se cuentan las células de una muestra que son capaces de formar colonias cuando se inoculan en un medio de cultivo sólido adecuado.

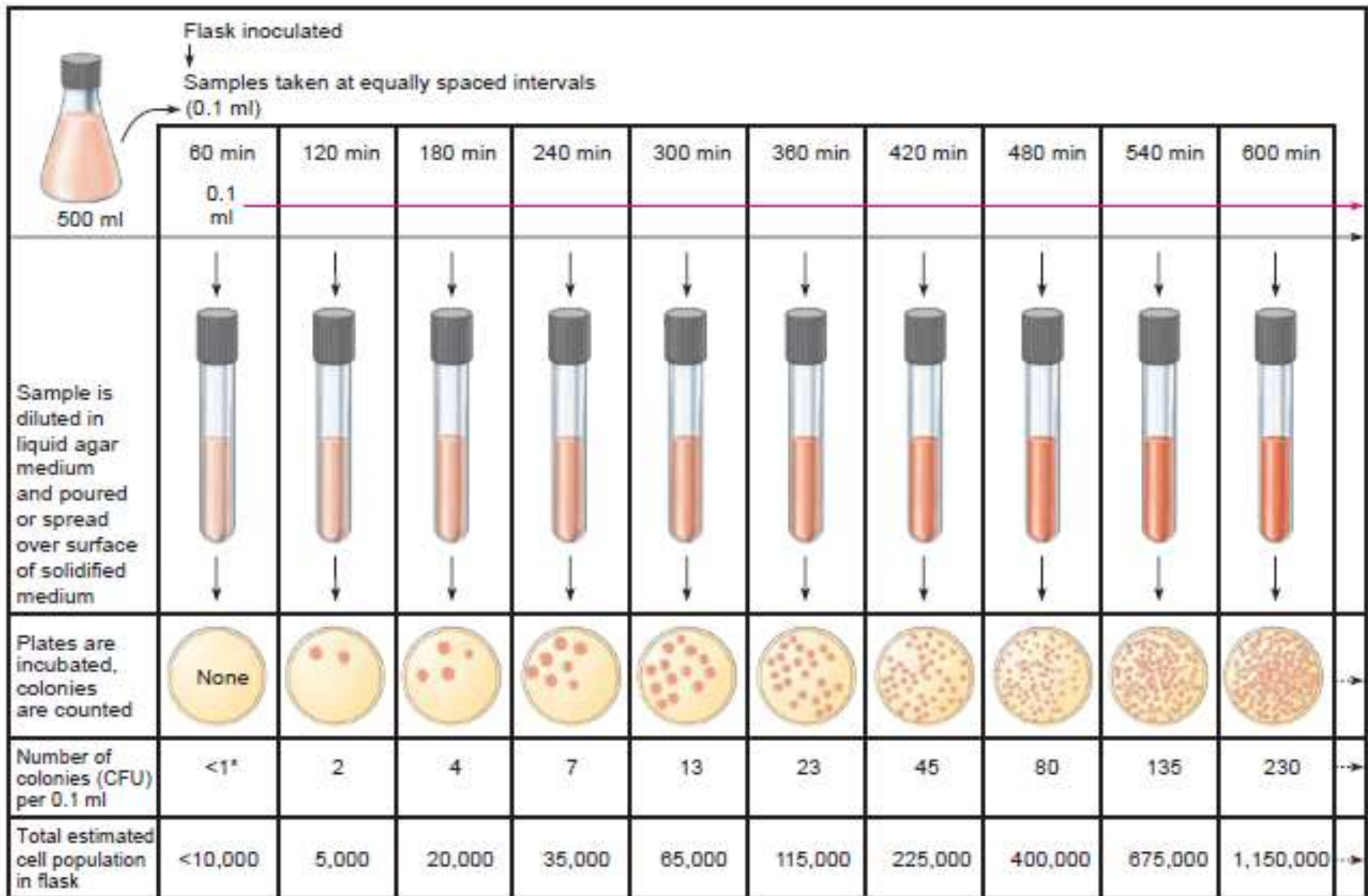
Antes de realizar la siembra usualmente se realizan diluciones seriadas

El resultado se expresa en **UFC / ml**

UFC/ml = colonias contadas x factor de dilución x volumen de inóculo

células viables





*Only means that too few cells are present to be assayed.

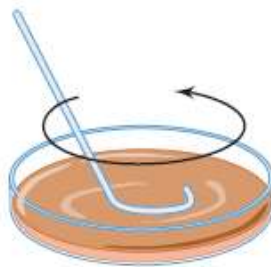
MÉTODOS DE MEDIDA DEL NÚMERO DE CÉLULAS

RECUENTO EN PLACA: métodos de siembra

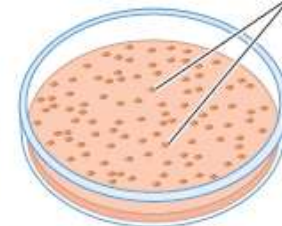
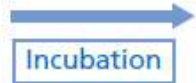
Spread-plate method



Sample is pipetted onto surface of agar plate (0.1 ml or less)

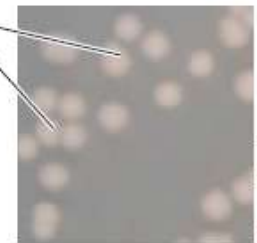


Sample is spread evenly over surface of agar using sterile glass spreader



Typical spread-plate results

Surface colonies



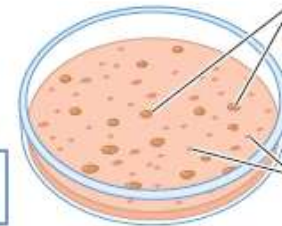
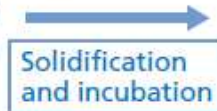
Pour-plate method



Sample is pipetted into sterile plate



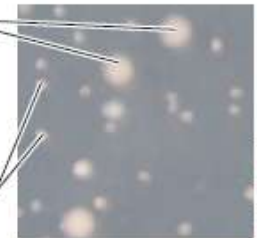
Sterile medium is added and mixed well with inoculum



Typical pour-plate results

Surface colonies

Subsurface colonies

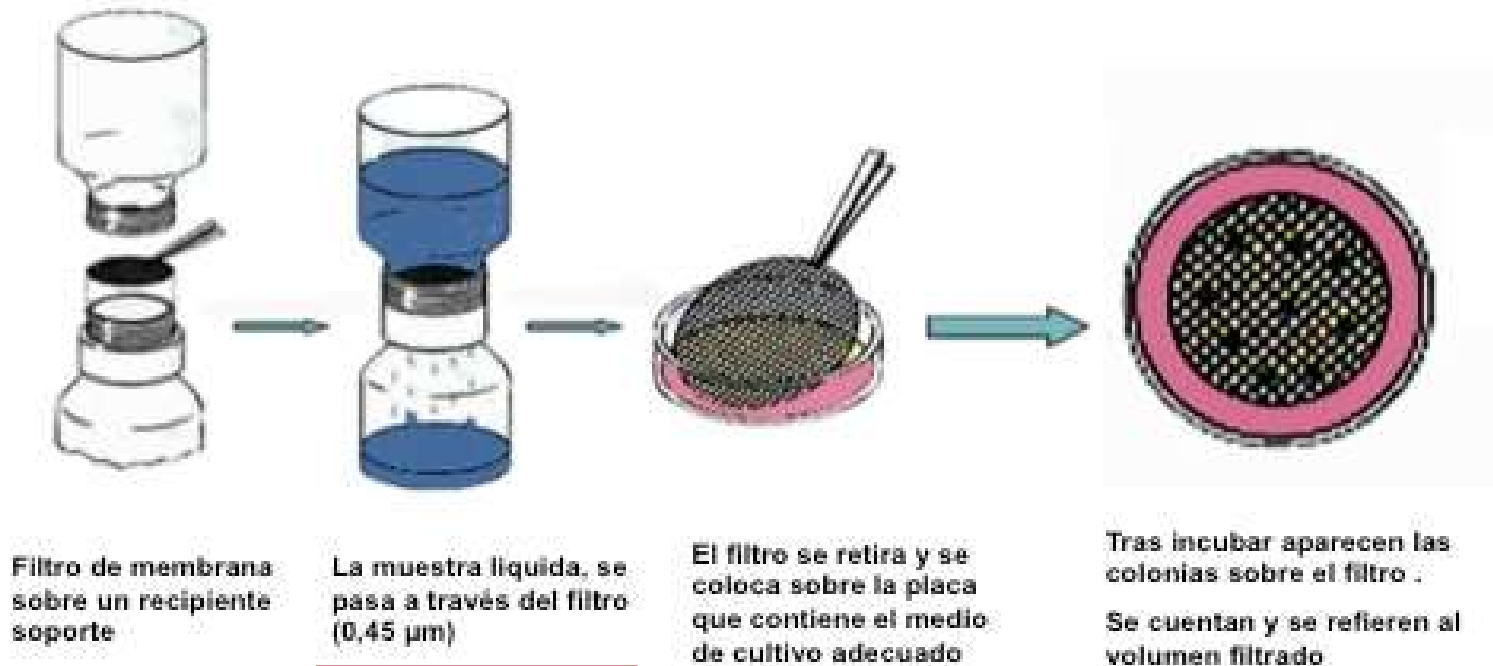


Permite inocular volúmenes mayores de muestra

MÉTODOS DE MEDIDA DEL NÚMERO DE CÉLULAS

RECUENTO SOBRE FILTROS DE MEMBRANA

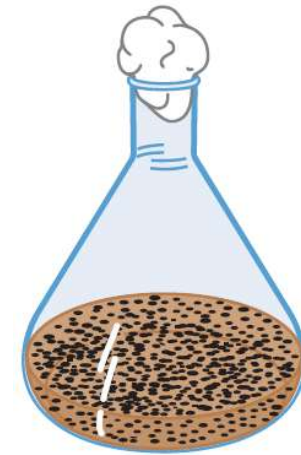
- Consiste en hacer pasar un volumen de una muestra muy diluida a través de un filtro de nylon o nitrocelulosa con un tamaño de poro adecuado. El filtro que retiene los microorganismos se coloca a continuación sobre una placa con medio de cultivo, tras incubación, aparecen colonias sobre el filtro (los nutrientes del medio difunden a través del filtro o que permite el crecimiento de los microorganismos)



células viables

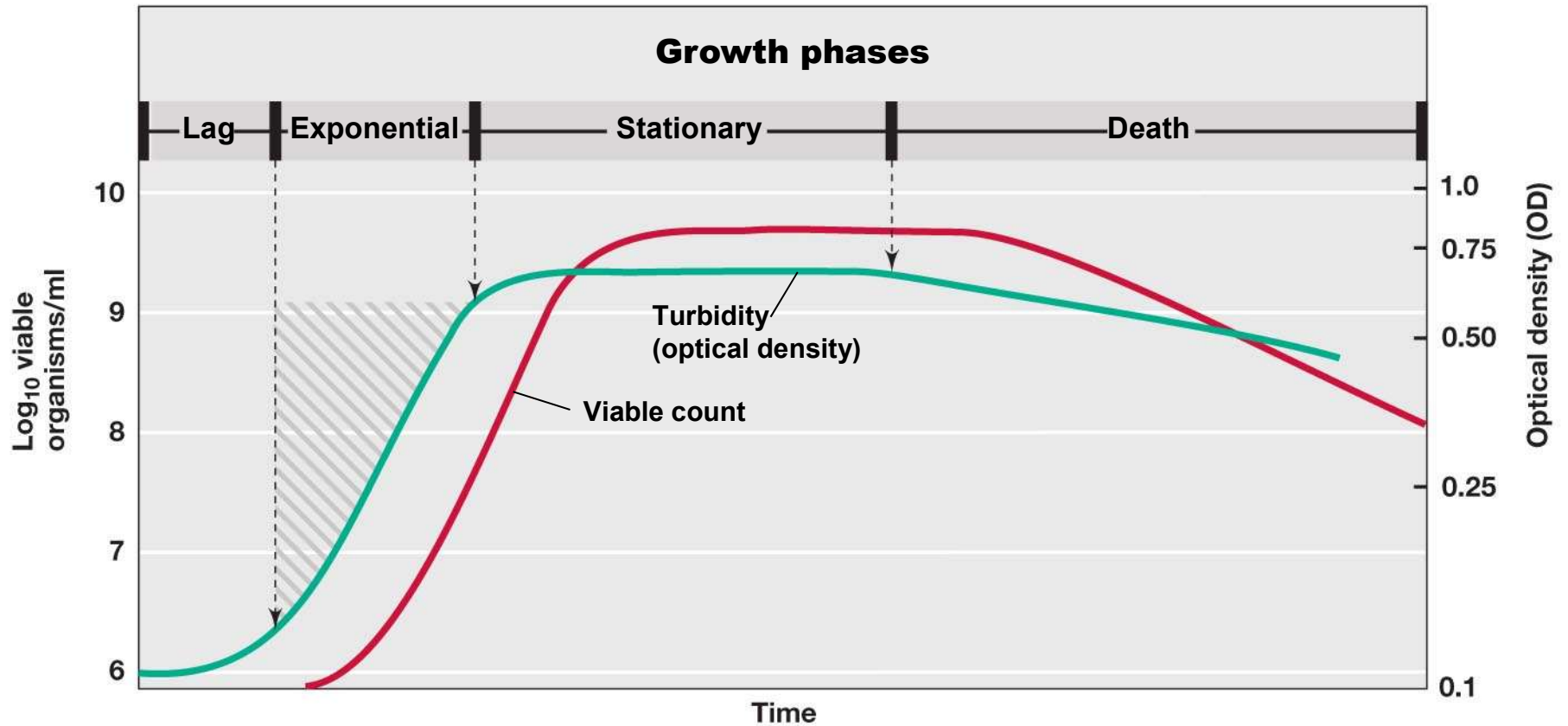
CRECIMIENTO EN SISTEMAS CERRADOS

- Es el más habitual en laboratorio (cultivo de microorganismos en medio líquido en erlenmeyers, tubos, frascos u otros recipientes)
- Ocurre en un volumen fijo de medio de cultivo, el que es modificado por los microorganismos
- No hay aporte nuevo de nutrientes ni es posible eliminar productos de desecho del cultivo
- Se observa una curva de crecimiento típica que se divide en varias fases
 - Fase de latencia
 - Fase exponencial
 - Fase estacionaria
 - Fase de muerte



CURVA DE CRECIMIENTO

$$\frac{dN}{dt} = \mu \cdot N$$



$$\mu = 0$$

$$\mu = \mu_{\max}$$

$$\mu = 0$$

$$\alpha = \text{veloc. específica de muerte}$$

$$\frac{dN}{dt} = 0$$

$$\frac{dN}{dt} = \mu_{\max} \cdot N$$

$$\frac{dN}{dt} = 0$$

$$\frac{dN}{dt} = \alpha \cdot N$$

CURVA DE CRECIMIENTO

Es la representación gráfica del logaritmo del número de células en función del tiempo

La curva teórica sería una recta si los microorganismos estuvieran creciendo constantemente, pero en la práctica la curva presenta distintas fases:

Fase de latencia (lag): Período de adaptación a las nuevas condiciones ambientales en un nuevo medio de cultivo

Fase de aceleración: Período donde las células mejor adaptadas comienzan a dividirse, por lo tanto lo hacen gradualmente

Fase exponencial o logarítmica (log): La población se incrementa de modo regular, duplicándose a intervalos regulares de tiempo. Se considera que son fisiológicamente iguales y el tiempo de generación es constante. La población aumenta en proporción a los componentes celulares

Fase estacionaria: Hay una merma en el crecimiento poblacional, esencialmente por agotamiento de nutrientes y acumulación de productos tóxicos.

Fase de declinación o de muerte: pérdida de viabilidad, lisis celular. Se debe a agotamiento de reservas de energía

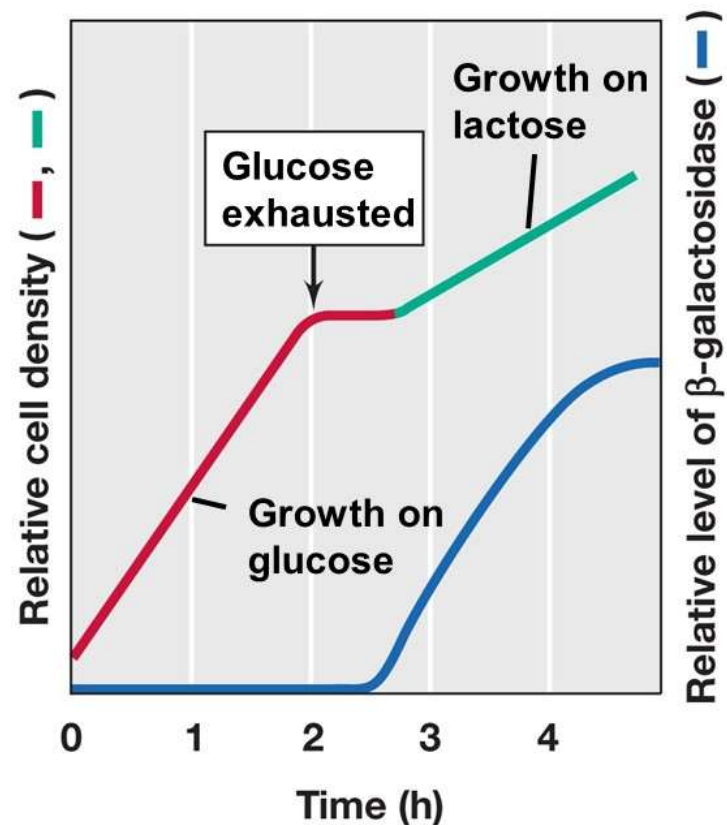
CRECIMIENTO EN SISTEMAS CERRADOS: CRECIMIENTO DIÁUXICO

Este tipo de crecimiento tiene lugar cuando una bacteria crece en un medio con dos fuentes de carbono, una de las cuales se usa con preferencia sobre la otra. Es consecuencia de la **represión catabólica** (mecanismo de regulación de la expresión génica)

Da lugar a una curva de crecimiento con dos fases exponenciales separadas por una fase estacionaria corta.

En un medio con glucosa y lactosa la glucosa es la fuente de carbono preferente y su presencia reprime la síntesis de la beta-galactosidasa, enzima necesaria para degradar lactosa.

Cuando se agota la glucosa la enzima se sintetiza y se reanuda el crecimiento.

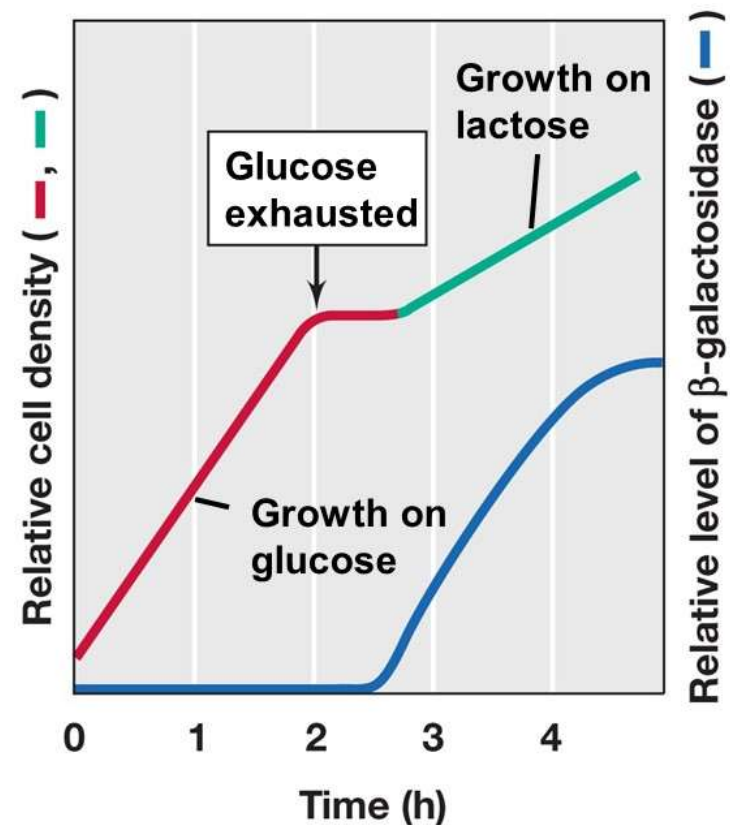


CRECIMIENTO EN SISTEMAS CERRADOS: CRECIMIENTO DIÁUXICO

Este tipo de crecimiento tiene lugar cuando una bacteria crece en un medio con dos fuentes de carbono, una de las cuales se usa con preferencia sobre la otra. Es consecuencia de la **represión catabólica** (mecanismo de regulación de la expresión génica)

Da lugar a una curva de crecimiento con dos fases exponenciales separadas por una fase estacionaria corta.

- Se inhiben las permeasas requeridas para el ingreso de otros azúcares (“**inducer expulsion**”)
- Se **reprime la síntesis** de enzimas catabólicas de otros azúcares si hay glucosa presente en el medio de cultivo (ej., operon *lac*)
- Asegura que la “mejor” fuente de carbon y energía se utiliza primero



CRECIMIENTO EN CULTIVO CONTINUO

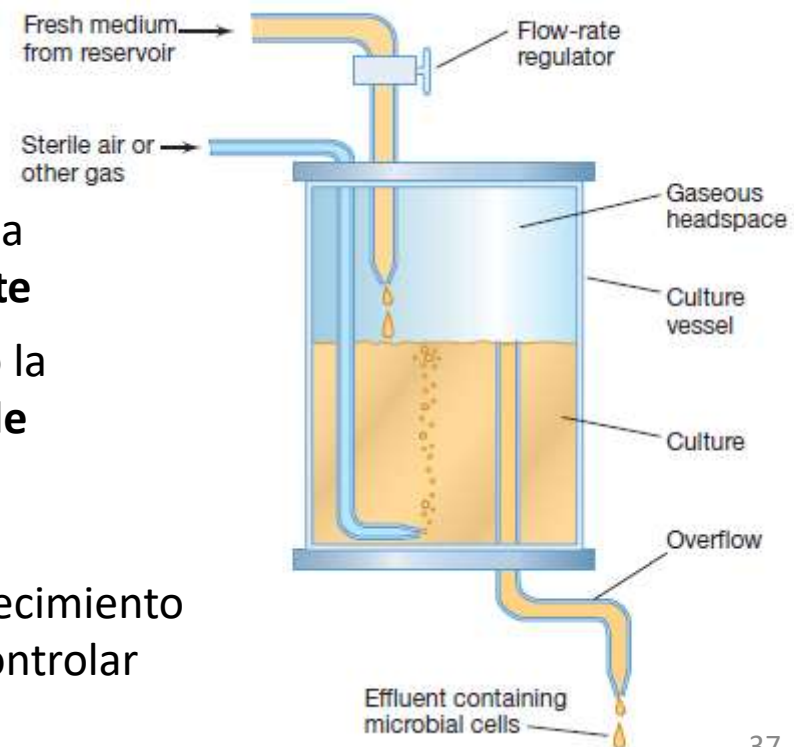
Quimostato: sistema abierto con volumen constante, al que continuamente se añade medio fresco de un reservorio y del que se retira medio usado que contiene microorganismos y sustancias de desecho a una velocidad constante.

El medio se renueva y su composición no cambia a lo largo del tiempo, lo que permite mantener el crecimiento de la población de forma indefinida (una vez alcanzado el estado de equilibrio)

Se controlan dos parámetros simultáneamente y de manera independiente:

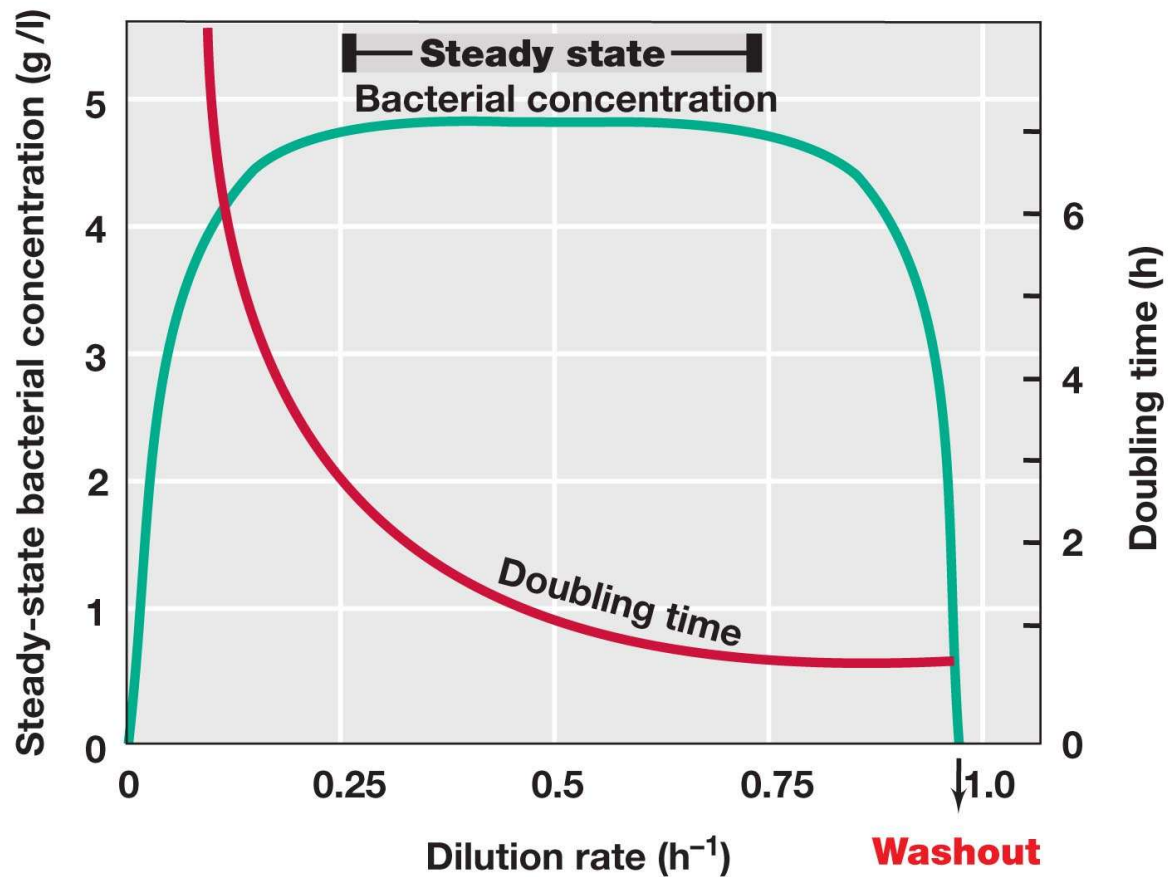
- La densidad de la población, variando la concentración de un **nutriente limitante**
- La velocidad de crecimiento, ajustando la velocidad de flujo o salida (**velocidad de dilución**)

En cultivos cerrados las condiciones de crecimiento cambian constantemente, es imposible controlar ambos parámetros independientemente



Los cultivos continuos son sensibles a la **velocidad de dilución** y la **concentración del nutriente limitante**:

- A velocidades muy altas de dilución, los microorganismos son lavados
- A velocidades de dilución muy bajas las células pueden morir por hambre
- El aumento de concentración de un nutriente limitante produce más biomasa pero la misma velocidad de crecimiento

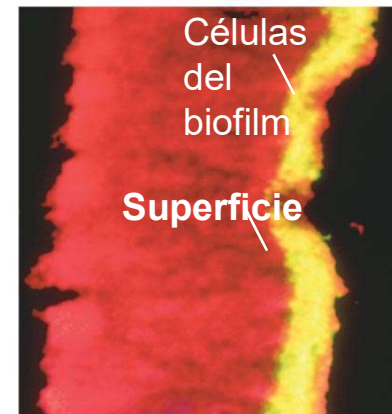


BIOFILMS

Agrupamientos de bacterias adheridas a una superficie y encerradas en una matriz adhesiva excretada por las células



J.M. Sánchez, J.J. deLope, and Ricardo Amils



C.-T. Huang, Karen Xu, Gordon McFeters, and Philip S. Stewart

BIOFILMS

La matriz es una mezcla de polisacáridos que atrapan nutrientes para el crecimiento microbiano y ayudan a evitar que las células superficiales se desprendan.

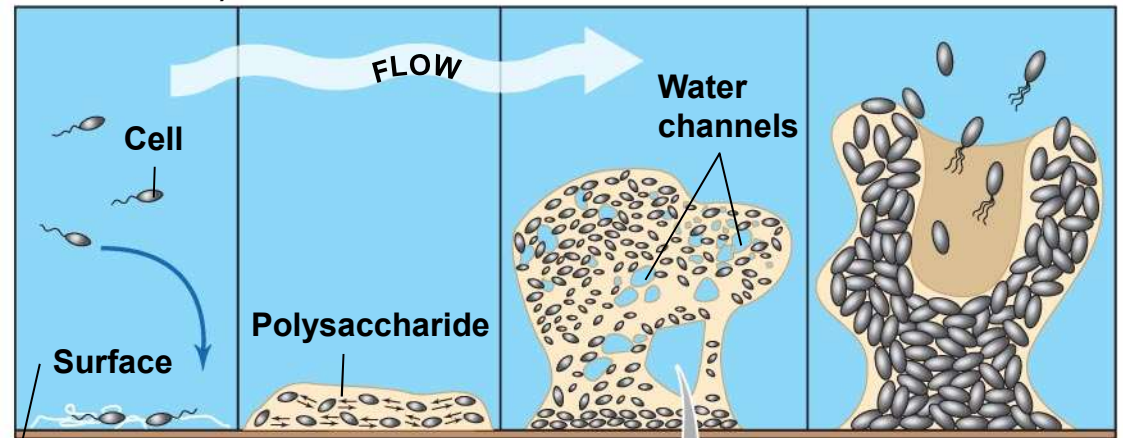
Ej: *Pseudomonas aeruginosa*

Produce polisacáridos que aumentan la patogenicidad y la resistencia a antibióticos

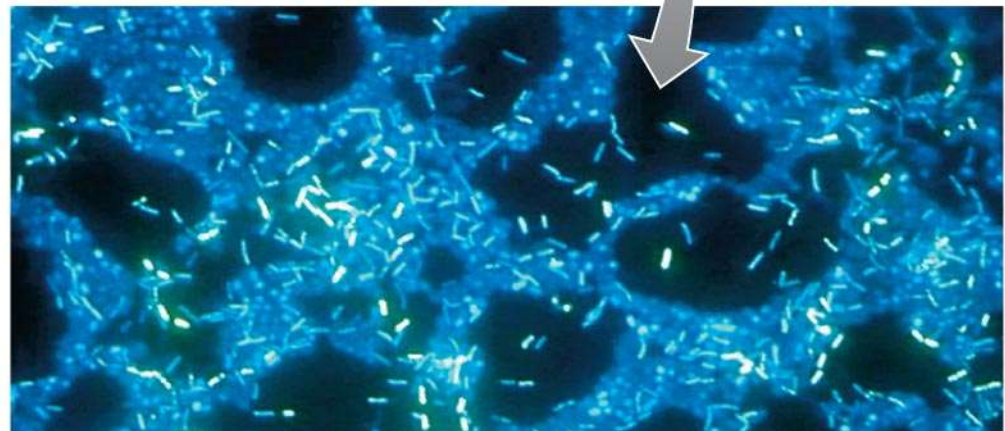
Su formación depende de la expresión de genes específicos activados por **quorum sensing**.

<https://www.youtube.com/watch?v=Aa8WE2LOOcQ>

Attachment (adhesion of a few motile cells to a suitable solid surface)	Colonization (intercellular communication, growth, and polysaccharide formation)	Development (more growth and polysaccharide)	Active Dispersal (triggered by environmental factors such as nutrient availability)
---	--	--	---



(a)



. Donlan and Emerging Infectious Diseases

Quorum Sensing

Mecanismo por el cual las bacterias miden la densidad de población

Los procariotas pueden responder a la presencia de otras células de la misma especie

Asegura que hay un número suficiente de células antes de iniciar una respuesta que, para ser efectiva, requiere una cierta densidad celular (ej., producción de toxinas en una bacteria patógena)

El primer sistema de quorum sensing descubierto fue la regulación de la producción de luz en bacterias: inducción del operón *lux* en *Aliivibrio fischeri*

<https://www.youtube.com/watch?v=mQ43fuJJW7M>



Timothy C. Johnston

Cada especie bacteriana produce un **autoinductor** específico

Autoinductor

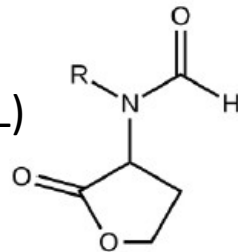
Difunde libremente a través de la envoltura celular

Alcanza altas concentraciones dentro de la célula solo si hay muchas células en las cercanías

Se une a activadores transcripcionales dentro de la célula o a histidín quinazas de sistemas de dos componentes y desencadena la transcripción de genes específicos

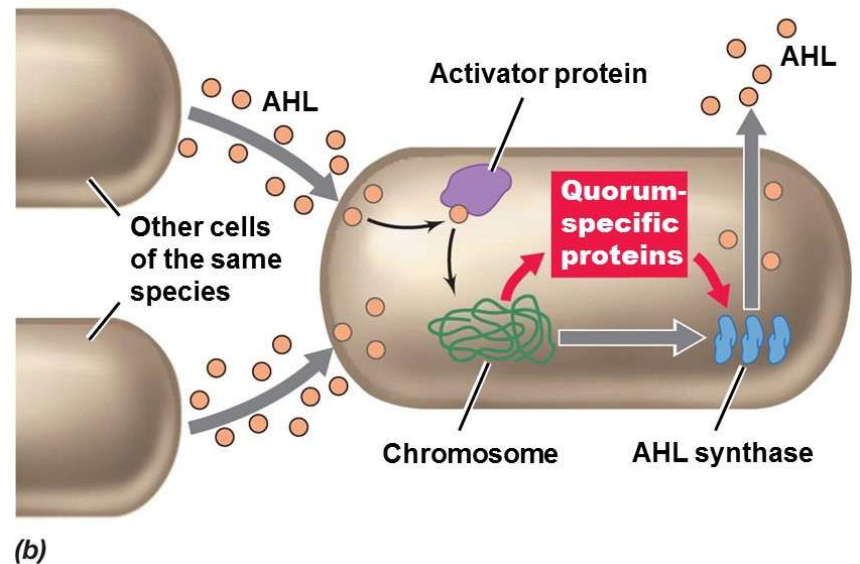
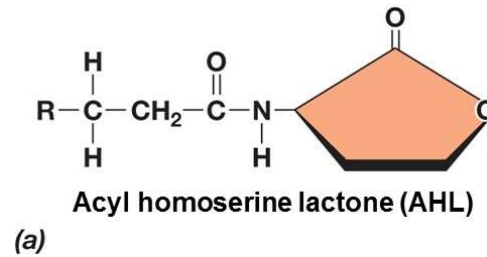
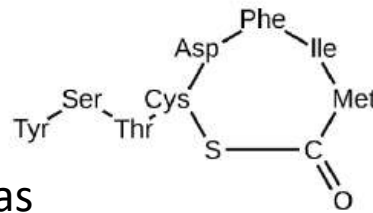
Gram negativas:

- acilhomoserina lactonas (AHL)
- AI-2 (furanona)



Gram positivas:

- oligopéptidos
- gamma butirolactonas



EFFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

EFFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

El crecimiento de los microorganismos está influenciado por los factores ambientales, los cuales determinan la distribución de los microorganismos en la naturaleza y a su vez permiten controlar sus actividades

Los principales factores que afectan al crecimiento bacteriano son:

- Temperatura
- Disponibilidad de agua y presión osmótica
- Oxígeno
- pH

Otros factores:

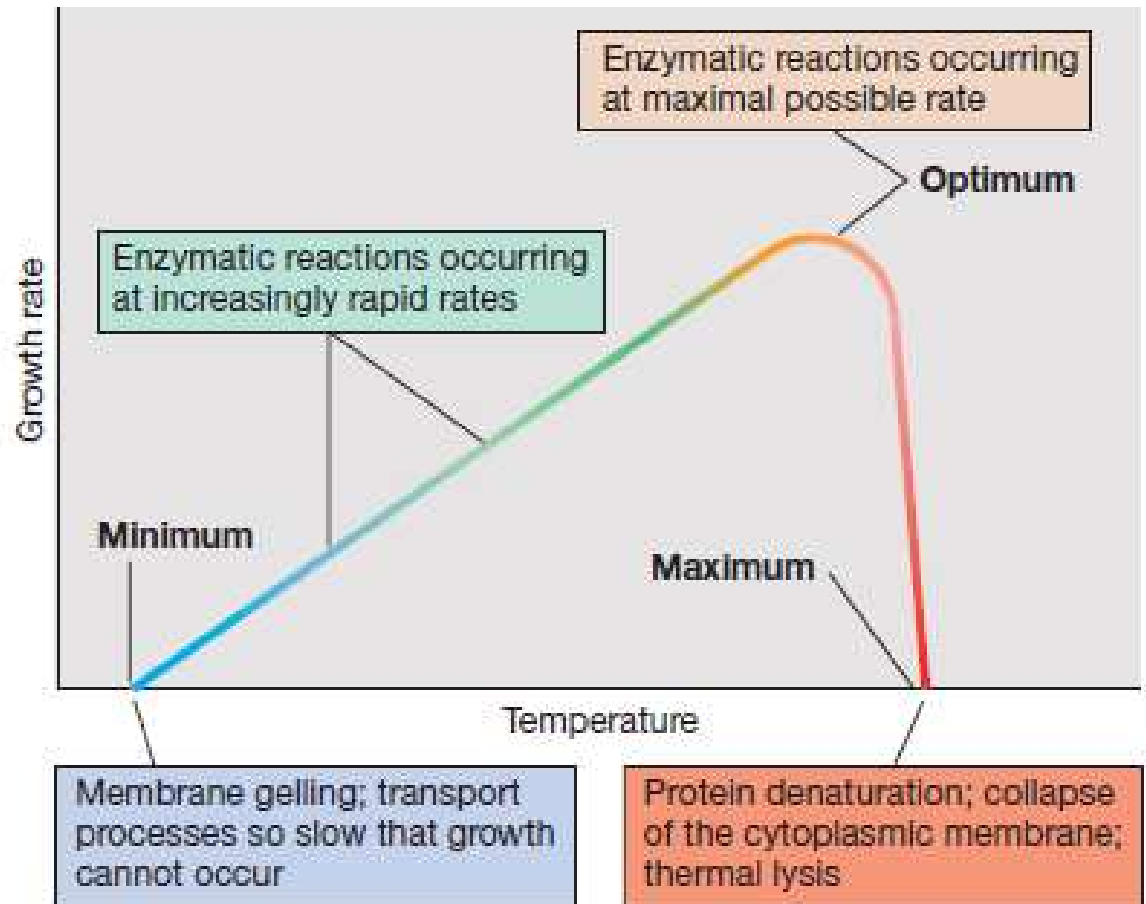
- Presión hidrostática
- Radiaciones

EFFECTO DE LA TEMPERATURA

Temperatura mínima: por debajo de la cual no hay crecimiento

Temperatura máxima: por encima de la cual no existe crecimiento

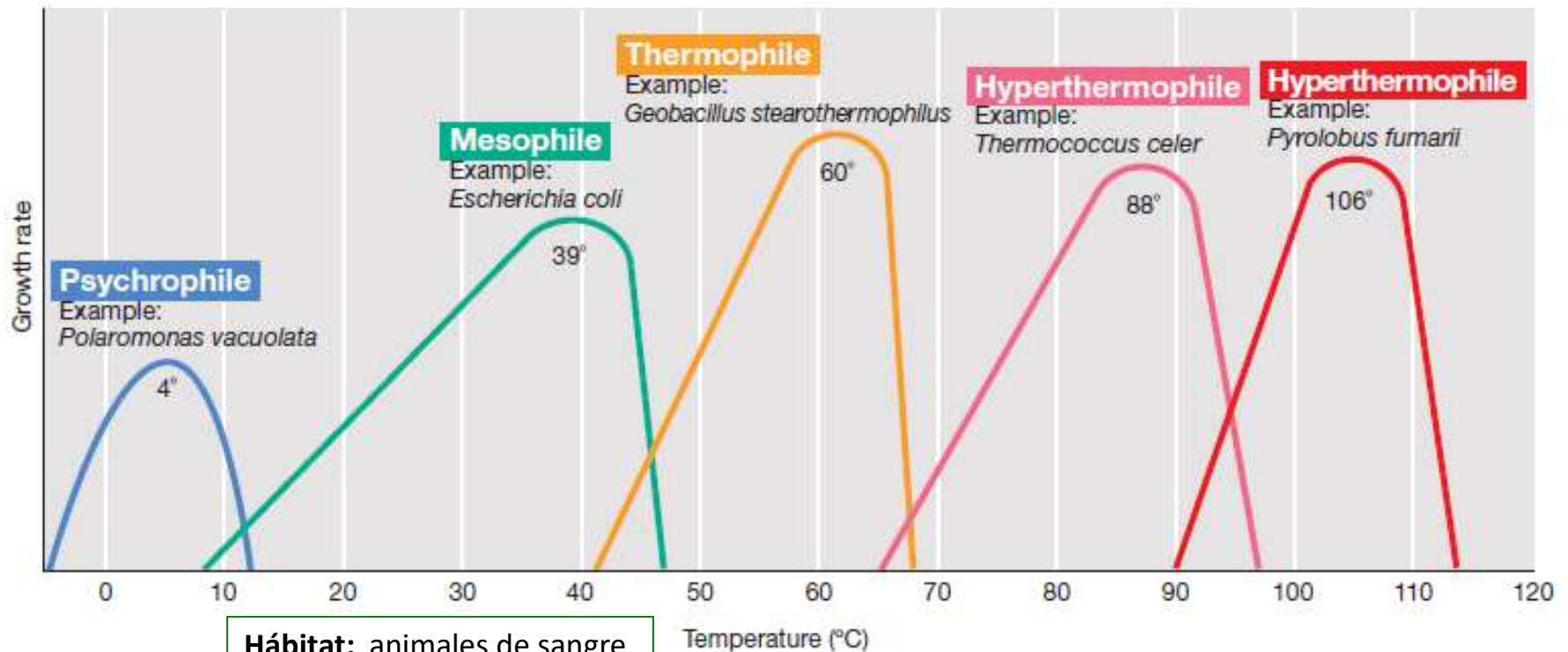
Temperatura óptima: a la que se da el mayor crecimiento.



CLASES DE MICROORGANISMOS EN RELACIÓN A LA TEMPERATURA ÓPTIMA

Hábitat: océanos, aguas congeladas, alimentos refrigerados

Hábitat: zonas volcánicas sometidas a insolación, materiales fermentados, fuentes hidrotermales



Hábitat: animales de sangre caliente, ambientes terrestres y acuáticos de zonas templadas y tropicales

VIDA MICROBIANA A BAJAS TEMPERATURAS

Extremófilos

Organismos que crecen en condiciones de mucho frío o mucho calor

- **Psicrófilos**

Organismos con bajas temperaturas óptimas de crecimiento.

Habitan permanentemente ambientes fríos

- **Psicrotolerantes**

Organismos que pueden crecer a 0°C

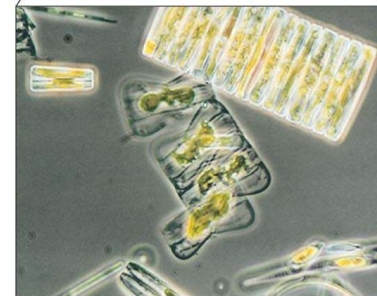
Pero tienen temperaturas óptimas

De crecimiento entre 20°C y 40°C

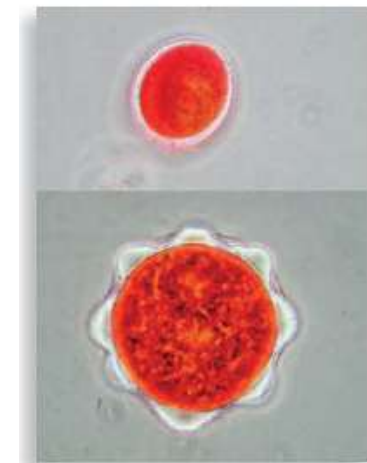
Están más ampliamente distribuidos en la naturaleza que los psicrófilos



(a)



(b)



VIDA MICROBIANA A BAJAS TEMPERATURAS

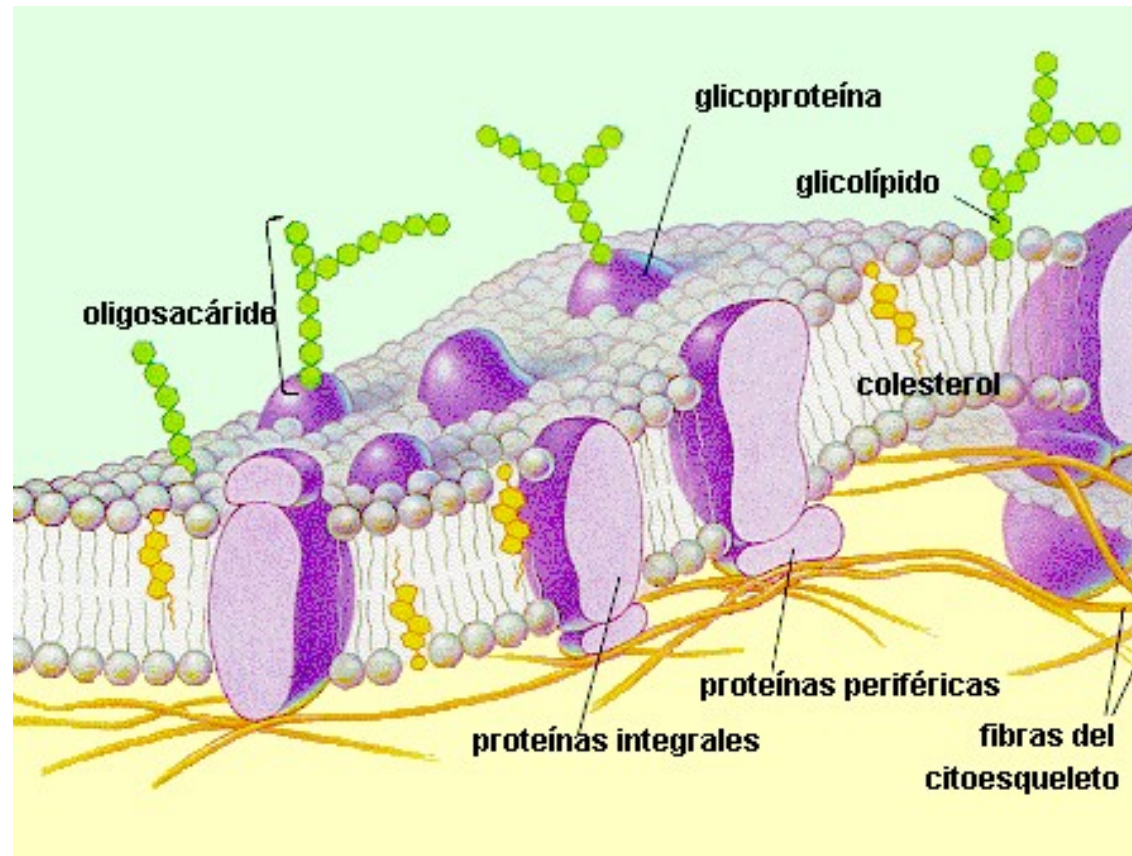
Adaptaciones moleculares que permiten el crecimiento a bajas temperaturas

- Producción de enzimas que funcionan óptimamente en frío; características que puede proporcionar más flexibilidad
 - Más α -helices que láminas plegadas β
 - Más aminoácidos polares y menos hidrofóbicos
 - Menor cantidad de uniones débiles
 - Menos interacciones entre dominios proteicos
- Modificación de membranas citoplasmáticas

Efecto del frío sobre las membranas

Se ven afectadas las actividades de las proteínas integrales de membrana:


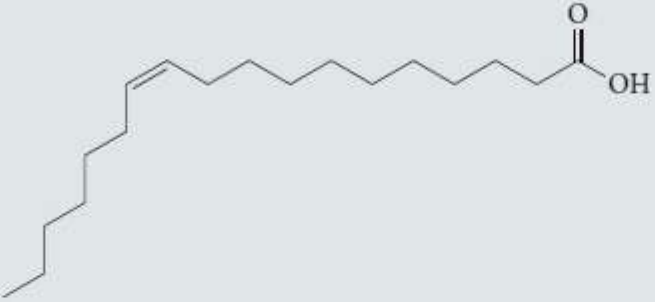

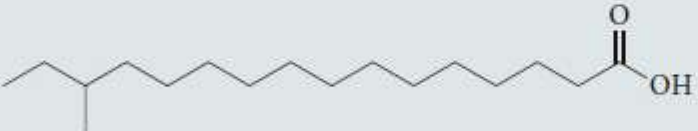
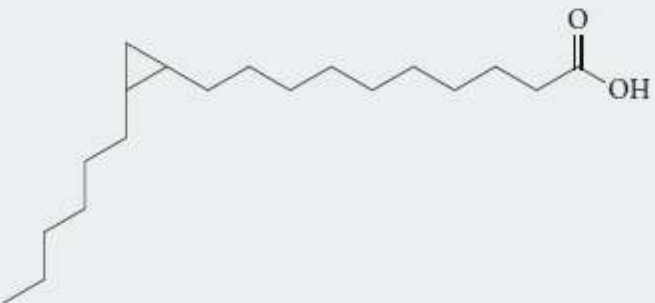
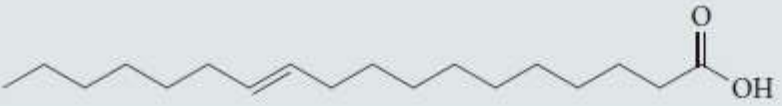
- transporte activo y pasivo
- sensado del ambiente
- movimiento celular
- catálisis enzimática
- generación de energía



Las propiedades biofísicas de las membranas están definidas en gran parte por las estructuras de los ácidos grasos que son incorporados a los fosfolípidos.

Los microorganismos se adaptan modificando la estructura y composición de los lípidos de la membrana (menor T_m)

Table 1 | **Chemical structures of membrane phospholipid fatty acids**

Fatty acid	Structure	Effect on membrane fluidity
C16:0		Decreases membrane fluidity
Cis-11-C18:1		Increases membrane fluidity
Iso-C17:0		Decreases membrane fluidity compared with <i>anteiso</i> -chains
Anteiso-C17:0		Increases membrane fluidity compared with <i>iso</i> -chains
Cyclopropane-C17:0		Mimics unsaturated fatty acids and increases stability to acid stress
Trans-11-C18:1		Mimics saturated fatty acids, and provides resistance to solvents and increases in growth temperature

Cambios en la composición de lípidos de membrana causada por disminución de la temperatura de crecimiento

Reordenamiento de las especies moleculares	Cambio rápido que involucra el intercambio de las cadenas de acilo del esqueleto de glicerol
Aumento en el grado de insaturación	Modificación <i>in situ</i> de lípidos, relativamente rápido. Mediado por desaturasas
Acortamiento de cadenas	Basada en la menor temperatura de melting de los ác.grasos de cadena corta
Alteración del tipo de ácido graso	Algunos microorganismos alteran la relación y la cantidad de los ác. grasos ramificados
Alteración de la clase de lípido	Cambios en la clase de lípidos, cuando la interconversión entre PL sea factible por ejemplo PE por PC que tiene menor T _m
Cambio en la relación lípido a proteína	La relación aumenta significativamente a baja T debido al aumento neto de síntesis de lípidos.

VIDA MICROBIANA A ALTAS TEMPERATURAS

- **Termófilos:** organismos con temperatura óptima de crecimiento entre 45°C y 80°C
- **Hipertermófilos:** organismos con temperatura óptima mayor a 80°C

Habitan ambientes calientes, incluyendo fuentes termales hirvientes y fumarolas hidrotermales del fondo marino, que pueden presentar temperaturas por encima de los 100°C

Estudios de ambientes termales revelaron que:

- Los procariotas son capaces de crecer a mayores temperaturas que los eucariotas. Por encima de ~65°C solo existen formas de vida procariota
- Los organismos con las más altas temperaturas óptimas pertenecen a *Archaea*
- Los organismos no fotótrofos pueden crecer a mayores temperaturas que los fotótrofos



Arroyo de agua hirviendo
Parque Nac. Yellowstone

VIDA MICROBIANA A ALTAS TEMPERATURAS

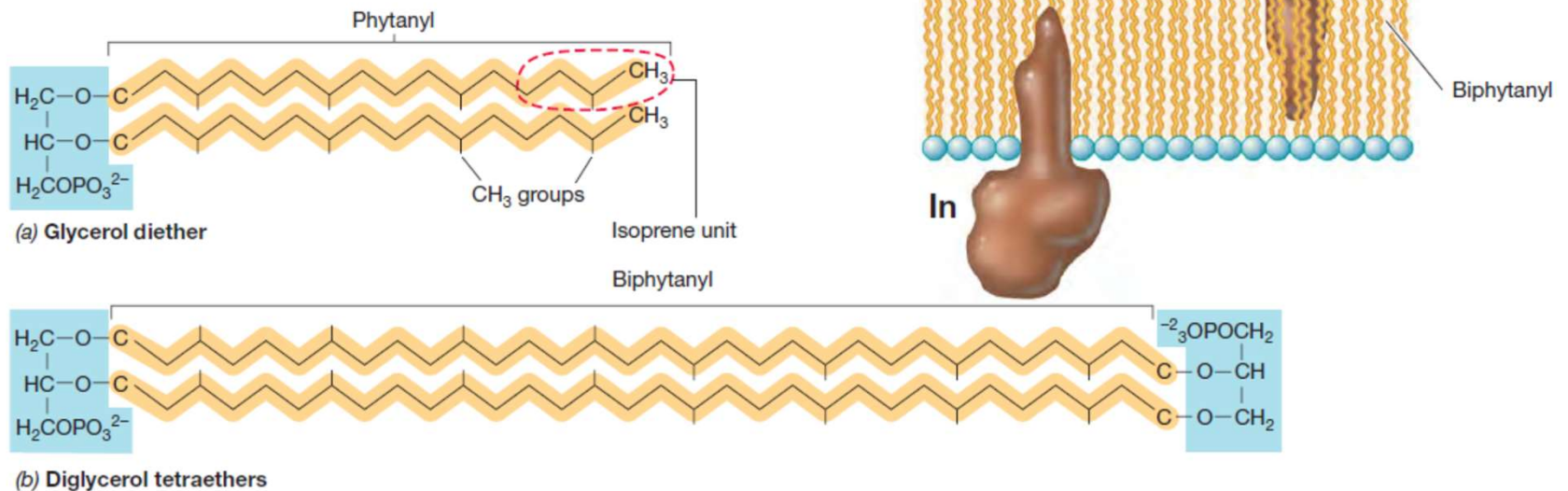
Adaptaciones moleculares que permiten el crecimiento a altas temperaturas

- Producción de enzimas y proteínas que funcionan óptimamente a altas temperaturas; características que proporcionan estabilidad térmica
 - Sustitución de aminoácidos críticos en unos pocos lugares generan plegamientos más tolerantes a la desnaturalización por calor
 - Número aumentado de enlaces iónicos entre aminoácidos básicos y ácidos
 - Producción de solutos (ej., di-inositol fosfato, diglicerol fosfato) que ayudan a estabilizar a las proteínas
- Modificaciones en las membranas citoplasmáticas para asegurar estabilidad térmica

VIDA MICROBIANA A ALTAS TEMPERATURAS

- Modificaciones en las membranas citoplasmáticas para asegurar estabilidad térmica

- *Bacteria* tienen lípidos enriquecidos en ácidos grasos saturados
- *Archaea* tienen monocapas lipídicas en lugar de bicapas



Los hipertermófilos producen enzimas ampliamente usadas en **microbiología industrial**.
Ej: *Taq* polimerasa, enzima de *Thermus aquaticus*, usada para automatizar los pasos repetitivos en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

DISPONIBILIDAD DE AGUA Y PRESIÓN OSMÓTICA

El agua libre se mide por la actividad de agua a_w cuyos valores oscilan entre 0 y 1

$$a_w = P_s/P_w$$

P_s = presión parcial de vapor de agua en la solución problema

P_w = presión parcial de vapor de agua destilada

a_w puede disminuir por interacciones con moléculas de soluto (efecto osmótico).

El agua difunde de regiones de alta concentración de agua a las de baja concentración. Hay ambientes **hipertónicos** (a_w baja) o **hipotónicos** (a_w alta).

A menor valor de a_w más dificultad tienen las bacterias para sobrevivir.

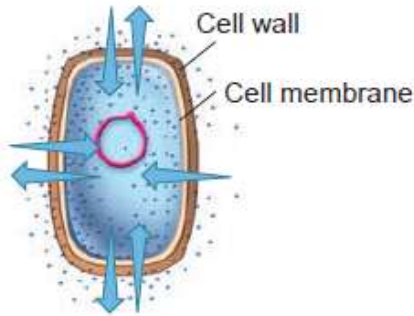
Table 5.3 Water activity of several substances

Water activity (a_w)	Material	Example organisms ^a
1.000	Pure water	<i>Caulobacter</i> , <i>Spirillum</i>
0.995	Human blood	<i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia</i>
0.980	Seawater	<i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i>
0.950	Bread	Most gram-positive rods
0.900	Maple syrup, ham	Gram-positive cocci such as <i>Staphylococcus</i>
0.850	Salami	<i>Saccharomyces rouxii</i> (yeast)
0.800	Fruit cake, jams	<i>Saccharomyces ballii</i> , <i>Penicillium</i> (fungus)
0.750	Salt lakes, salted fish	<i>Halobacterium</i> , <i>Halococcus</i>
0.700	Cereals, candy, dried fruit	<i>Xeromyces bisporus</i> and other xerophilic fungi

^aSelected examples of prokaryotes or fungi capable of growth in culture media adjusted to the stated water activity.

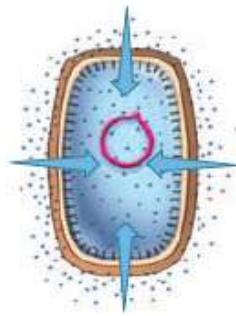
Cells with Cell Wall

Isotonic Solution



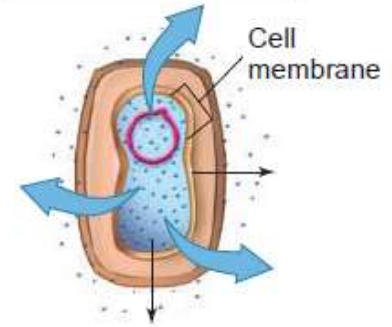
Water concentration is equal inside and outside the cell, thus rates of diffusion are equal in both directions.

Hypotonic Solution



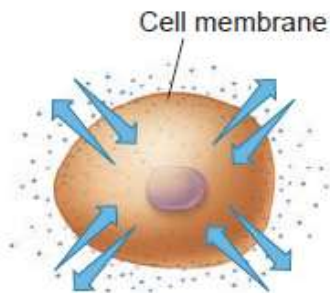
Net diffusion of water is into the cell; this swells the protoplast and pushes it tightly against the wall. Wall usually prevents cell from bursting.

Hypertonic Solution

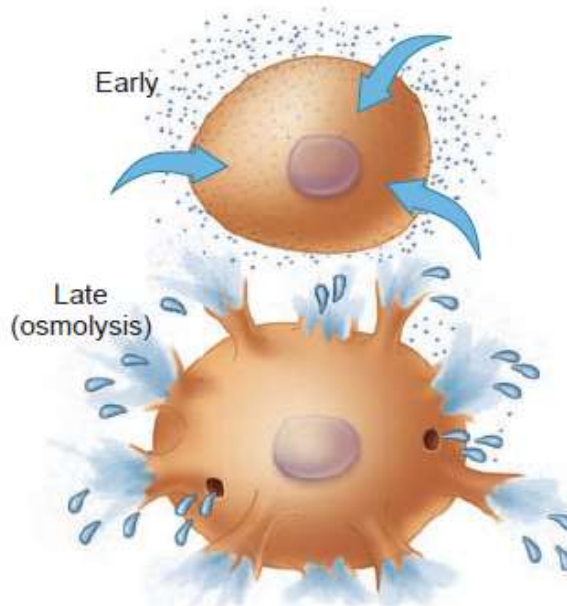


Water diffuses out of the cell and shrinks the cell membrane away from the cell wall; process is known as **plasmolysis**.

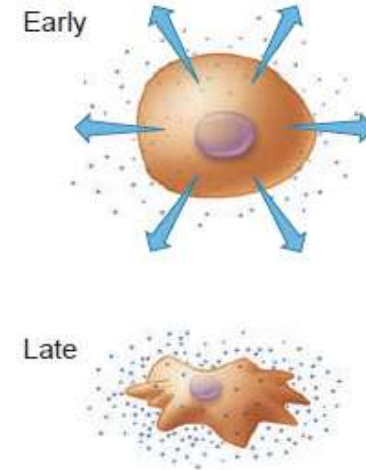
Cells Lacking Cell Wall



Rates of diffusion are equal in both directions.



Diffusion of water into the cell causes it to swell, and may burst it if no mechanism exists to remove the water.

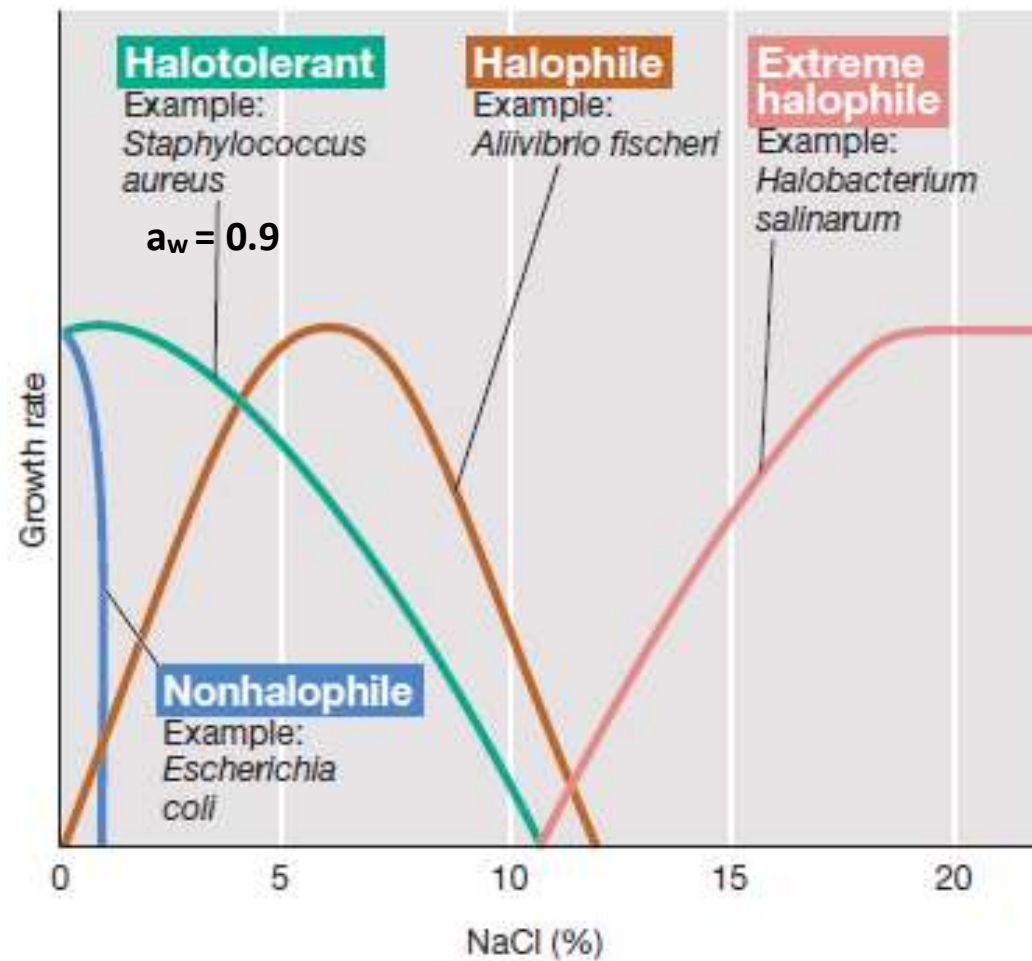


Water diffusing out of the cell causes it to shrink and become distorted.

➡ Direction of net water movement.

DISPONIBILIDAD DE AGUA Y PRESIÓN OSMÓTICA

CLASES DE MICROORGANISMOS



DISPONIBILIDAD DE AGUA Y PRESIÓN OSMÓTICA

Adaptaciones al aumento de la presión osmótica externa

Osmotolerantes:

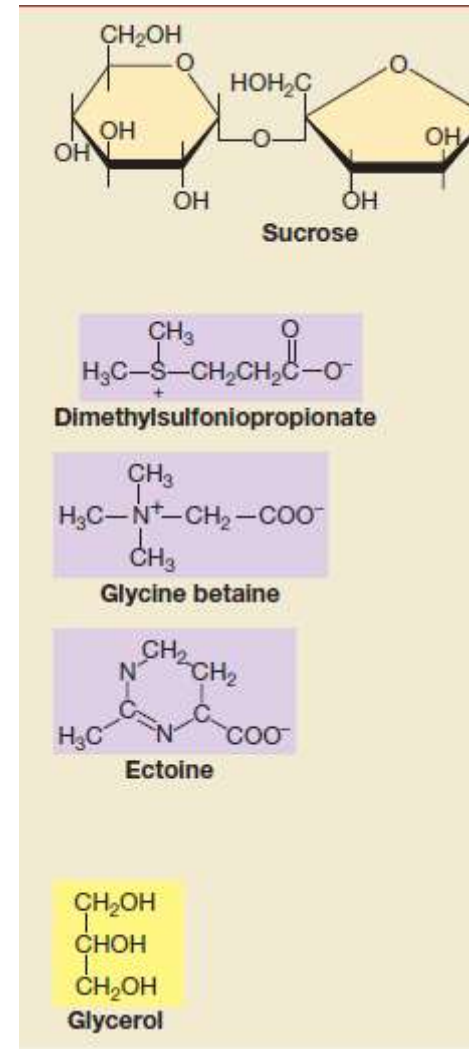
Mantienen elevada su concentración interna de solutos

- Bombeo de iones desde el exterior
- Síntesis y/o concentración de solutos compatibles: sacarosa, trehalosa, polialcoholes (glicerol, manitol), aminoácidos (colina, betaína, prolina, etc)

Halófilos extremos:

Concentran además ión K^+ (hasta 4-7 mM) que es necesario para:

- Estabilidad de las proteínas transportadoras, enzimas y ribosomas
- Mantenimiento estable de pared celular y membrana plasmática



EFFECTO DEL OXÍGENO SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

- El oxígeno comprende alrededor de 20% de los gases atmosféricos
- Es un importante aceptor final de electrones en la respiración
- Es un poderoso oxidante, que genera diversas especies tóxicas

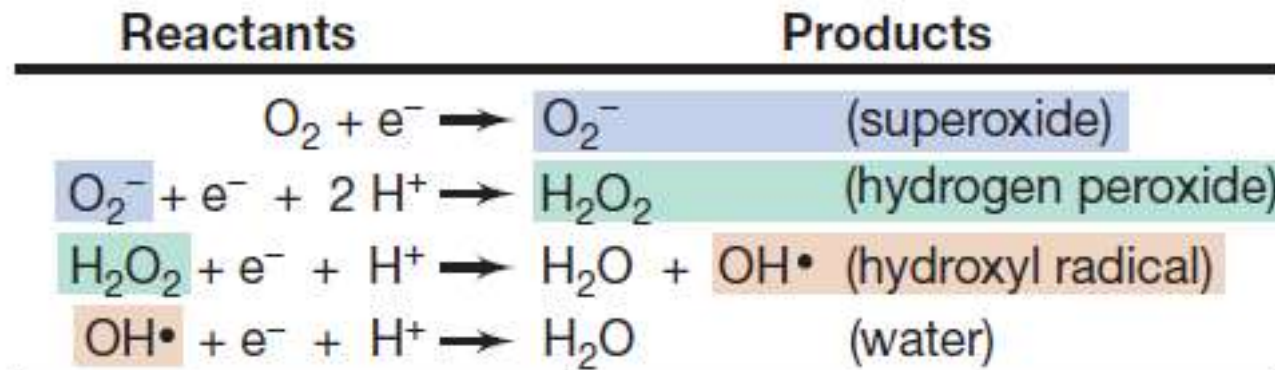
Los microbios se pueden separar en tres categorías:

- Los que usan el oxígeno y lo pueden detoxificar
- Los que no lo usan ni lo pueden detoxificar
- Los que no lo usan pero lo pueden detoxificar

OXÍGENO Y CRECIMIENTO BACTERIANO

El oxígeno es un **potente oxidante** y es el mejor aceptor de electrones para la respiración, pero puede ser letal para las bacterias ya que durante el proceso de reducción hasta agua se generan formas tóxicas (radical superóxido y peróxido de hidrógeno).

Las flavoproteínas, quinonas y hierro-sulfoproteínas, pueden también catalizar la reducción de oxígeno a superóxido, aunque no haya respiración aeróbica. Estos productos oxidan los compuestos orgánicos celulares, incluyendo las macromoléculas



Outcome:



OXÍGENO Y CRECIMIENTO BACTERIANO

Enzimas detoxificantes: destruyen especies tóxicas del oxígeno



CATALASA: Convierte el Peróxido de Hidrógeno (Agua Oxigenada) en Agua y Oxígeno. Es una proteína con porfirina.



PEROXIDASA: Convierte el Peróxido de Hidrógeno (Agua Oxigenada) en Agua en presencia de NADH reducido. Es una proteína con porfirina.



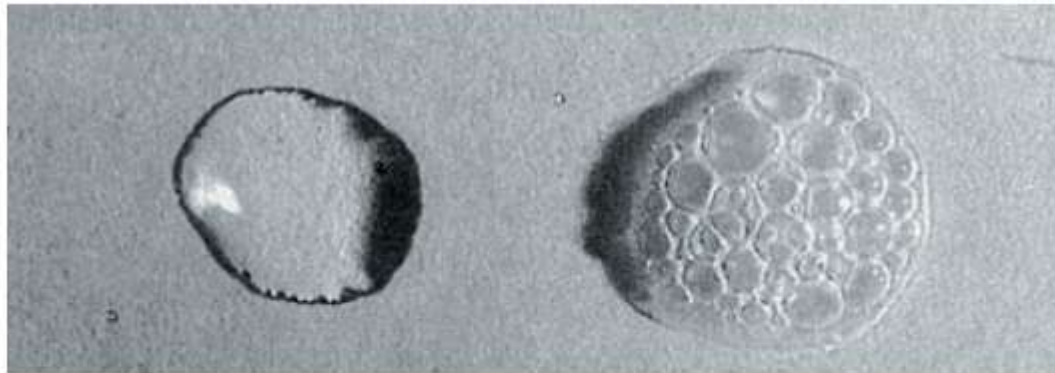
SUPEROXIDO DISMUTASA: genera Peróxido de Hidrógeno y Oxígeno a partir de 2 moléculas de superóxido. Es una proteína con Cu y Zn, Mn o Fe. Esencial en bacterias aerobias y ausente en anaerobios estrictos



SUPEROXIDO DISMUTASA + CATALASA: Convierten el superóxido en Agua y Oxígeno



SUPEROXIDO REDUCTASA: Convierten el superóxido en Peróxido de Hidrógeno, utilizando rubredoxina como agente reductor. Presente en Arqueas anaerobios estrictos (*Pyrococcus furiosus*, metanógenos) y en algunas bacterias anaerobias estrictas (Sulfatorreductoras) o microaerófilas (*Treponema*)



T. D. Brock

Figure 5.30 Method for testing a microbial culture for the presence of catalase. A heavy loopful of cells from an agar culture was mixed on a slide (right) with a drop of 30% hydrogen peroxide. The immediate appearance of bubbles is indicative of the presence of catalase. The bubbles are O_2 produced by the reaction $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$.

EFFECTO DEL OXÍGENO SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

Aerobios: requieren oxígeno para vivir

- **Aerobios estrictos**
- **Microaerófilos:** pueden usar el oxígeno solo si está presente en niveles menores que en el aire

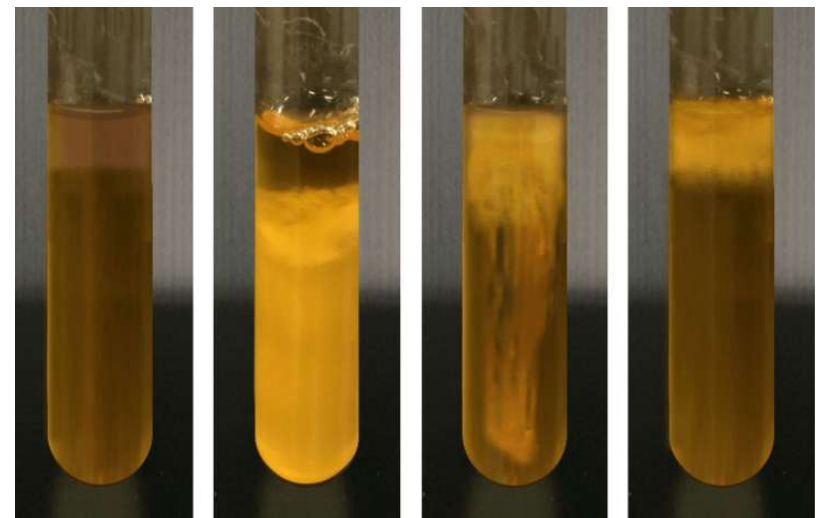
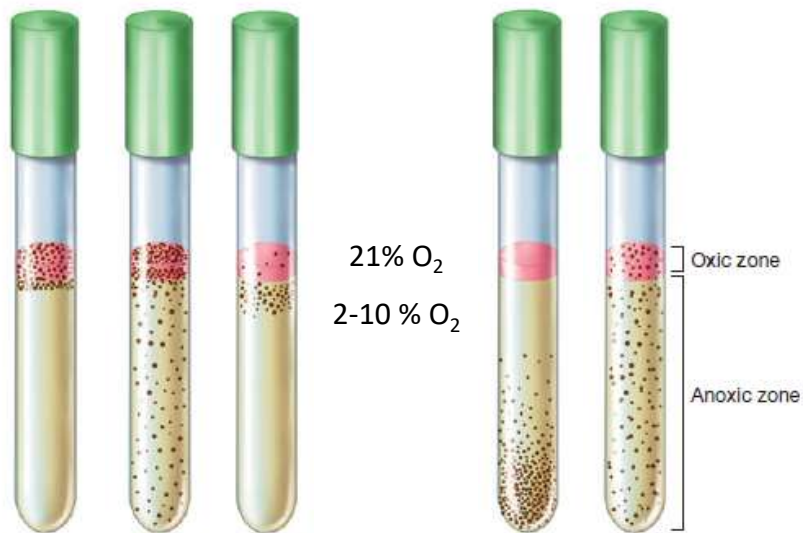
Anaerobios: no requieren oxígeno para vivir

- **Anaerobios estrictos:** mueren si son expuestos al oxígeno
- **Anaerobios aerotolerantes:** pueden tolerar el oxígeno y crecer en su presencia aunque no puedan usarlo

Microorganismos facultativos: pueden vivir con o sin oxígeno

EFEECTO DEL OXÍGENO SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

Group	Relationship to O ₂	Type of metabolism	Example ^a	Habitat ^b
Aerobes				
Obligate	Required	Aerobic respiration	<i>Micrococcus luteus</i> (B)	Skin, dust
Facultative	Not required, but growth better with O ₂	Aerobic respiration, anaerobic respiration, fermentation	<i>Escherichia coli</i> (B)	Mammalian large intestine
Microaerophilic	Required but at levels lower than atmospheric	Aerobic respiration	<i>Spirillum volutans</i> (B)	Lake water
Anaerobes				
Aerotolerant	Not required, and growth no better when O ₂ present	Fermentation	<i>Streptococcus pyogenes</i> (B)	Upper respiratory tract
Obligate	Harmful or lethal	Fermentation or anaerobic respiration	<i>Methanobacterium formicicum</i> (A)	Sewage sludge, anoxic lake sediments



Control sin
inocular

Crecimiento en Agar tioglicolato, el oxígeno penetra sólo en la parte superior del tubo. Indicador redox: resazurina

OXÍGENO Y CRECIMIENTO BACTERIANO



Deborah O. Jung and M. T. McEligan

Jarra de anaerobiosis. Una reacción química en el sobre de la jarra genera H_2 y CO_2 . El H_2 reacciona con el O_2 de la jarra sobre una superficie de catalizador (Pd) para dar H_2O . La atmósfera final contiene N_2 , H_2 y CO_2



Coy Laboratory Products

Cámara aneróbica. Está equipada con guantes para el manejo de anaerobios estrictos sin exponerlos al aire. Están provistas de sistemas de evacuación de aire y llenado de gas libre de O_2



EFECTO DEL pH

Alteraciones por variaciones del pH del medio:

- Inestabilidad de la membrana plasmática
- Intercambio de hidrogeniones
- Modificación de la concentración interna de $[H^+]$
- Cambia la ionización de las moléculas
- Desnaturalización de proteínas: inhibición de actividad enzimática y transporte

Mecanismos de adaptación

- Sistemas antiporte potasio/protones o sodio/protones
- Síntesis de ATPasas traslocadoras de protones que expulsan protones al medio
- Síntesis de chaperonas para corregir proteínas desplegadas

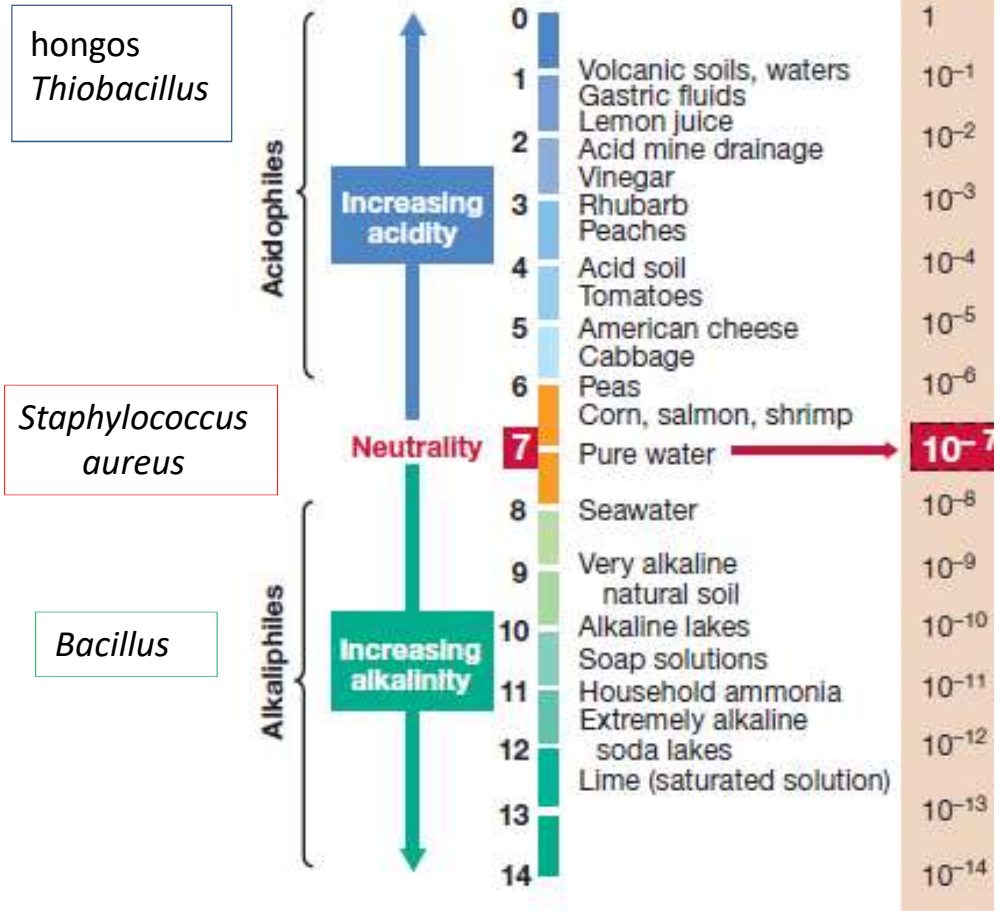


Table 5.2 Relationships of microorganisms to pH

<i>Physiological class (optima range)</i>	<i>Approximate pH optimum for growth</i>	<i>Example organism^a</i>
Neutrophile (pH >5.5 and <8)	7	<i>Escherichia coli</i>
Acidophile (pH <5.5)	5	<i>Rhodospila globiformis</i>
	3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
	1	<i>Picrophilus oshimae</i>
Alkaliphile (pH \geq 8)	8	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
	9	<i>Bacillus firmus</i>
	10	<i>Natronobacterium gregoryi</i>

^a *Picrophilus* and *Natronobacterium* are Archaea; all others are Bacteria.

Buffers