

**FISIOLOGÍA MICROBIANA**  
**LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUIMICAS**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**GUÍAS TEÓRICO-PRÁCTICAS**  
**2025**

Diseño y confección: Dra. Jorgelina Morán Barrio, Dra. Luciana Paoletti,  
Dr. Diego Serra, Dr. Luciano Brambilla, Dra. Lucía Porrini, Dr. Marcelo Merli y  
Dr. Eduardo Rodríguez, Dr. Silvia Altabe

## Índice

Objetivos.....	3
Introducción a la microbiología .....	4
Capítulo I.A: Métodos de esterilización y desinfección.....	16
Capítulo I.B: Medio de cultivos, siembra y aislamiento.....	45
Capítulo I.C: Observación de los microorganismos.....	56
Capítulo II.A: Nutrición y metabolismo bacteriano.....	70
Capítulo II.B: Microorganismos en la naturaleza y biotecnología .....	81
Capítulo III: Crecimiento microbiano.....	88
Capítulo IV: Ecología microbiana.....	104

## Objetivos generales

- 1) Introducción al trabajo en el laboratorio de microbiología.
- 2) Manejo de las técnicas microbiológicas: inoculación, incubación, aislamiento y observación.
- 3) Conocimiento fundamentado de los requerimientos nutricionales de los microorganismos, consecuencias de su desarrollo en el medio y sus aplicaciones.

## Normas de seguridad

Uno de los aspectos básicos del trabajo en el laboratorio de microbiología es saber mantener normas de seguridad mínimas. El conocimiento y aplicación de las mismas está destinada a lograr actitudes y conductas que disminuyan el riesgo del estudiante o trabajador de sufrir infecciones o lesiones en el medio laboral, ambiente éste que debe estar diseñado en el marco de una estrategia de disminución de riesgos.

En el curso no se utilizarán microorganismos patógenos, pero se realizarán aislamientos de fuentes naturales pudiendo aparecer algún posible patógeno, por lo que se piden seguir las siguientes reglas:

- 1) No comer, beber, fumar ni maquillarse** en el laboratorio, ni llevarse a la boca ningún elemento utilizado (biomes, marcadores, dedos, etc.)
- 2) Es obligatorio asistir al laboratorio con guardapolvo**, de mangas largas y con puño. Las personas de **pelo largo** deben concurrir con el mismo **atado y/o recogido**.
- 3) Si se vuelca un cultivo**, informar inmediatamente al docente con el cual se procederá a limpiar la zona con solución bactericida.
- 4) El material contaminado** (tips, pipetas, tubos), se descartará en envases provistos a tal efecto.
- 5) No volcar cultivos** en las piletas.
- 6) Una vez finalizada la clase lavarse las manos** escrupulosamente con agua y jabón y algún desinfectante (lo mismo durante la clase si accidentalmente se tocó algún cultivo).

## Condiciones de regularidad de la materia

- 1) Aprobación de los Trabajos Prácticos (TPs):
  - a. 80% de asistencia (15/18 citaciones),
  - b. 80% de parcialitos aprobados (6/7). Se tomará uno por cada TP al comienzo del mismo.
  - c. Informe final por grupo, con presentación escrita y oral de los resultados de los TPs.
- 2) Aprobación del parcial y/o recuperatorio con una nota mínima del 60% del total del puntaje.

## Condiciones de promoción de la materia

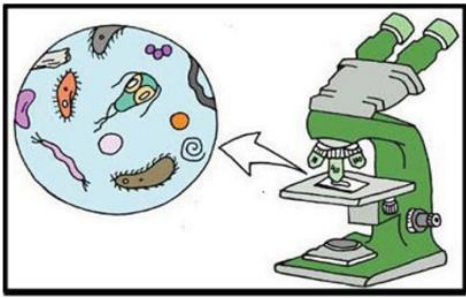
- 1) Aprobación de los Trabajos Prácticos (TPs).
- 2) Aprobación del parcial y/o recuperatorio con una nota mínima del 60% del total del puntaje, con un valor mínimo del 60% del valor de cada pregunta.

## Bibliografía recomendada

- Brock. Biología de los Microorganismos. 2021. 16ª edición. Ed. Pearson.
- Foundations in microbiology. Kathleen Park Talaro, Barry Chess. 10th ed. 2018.
- The physiology and biochemistry of prokaryotes (2a. ed., 2000), de D. White, Oxford University Press.
- Manual de Medios de Cultivo Merck. 1994
- Structural and Functional Relationships in Prokaryotes. Larry - Barton. 2005

Docentes a cargo de comisiones: **Dra. Jorgelina Morán Barrio, Dra. Luciana Paoletti, Dr Luciano Brambilla, Dr. Diego Serra, Dr. Lucia Porrini, Dr. Marcelo Merli**  
**Profesores: Dra. Silvia Altabe, Dr. Eduardo Rodríguez, Dr. Antonio Uttaro**

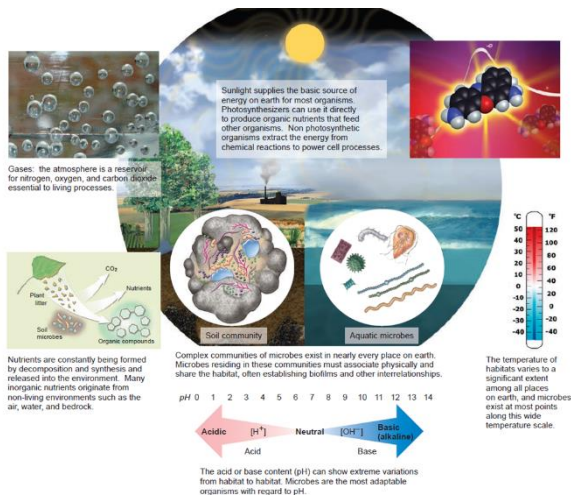
# Introducción a la microbiología



La Microbiología es la ciencia que estudia los seres vivos microscópicos (microorganismos), cuyo tamaño está por debajo del poder resolutorio del ojo humano. Se desarrolló como disciplina científica en el siglo XVII con la invención del microscopio. Esta definición implica que el campo de estudio de la Microbiología está determinado por el tamaño de los seres que investiga. 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.

Los microorganismos están presentes en cualquier lugar de la Tierra propicio para mantener la vida. Este universo microscópico alberga una vasta y compleja comunidad microbiana, presente en todos los hábitats naturales y en la mayoría de los entornos que han sido creados por los seres humanos. Existen microorganismos por debajo de los casquetes polares, en el océano a profundidades que exceden los 10 km, en las aguas y respiraderos termales, en vertederos de residuos tóxicos, e incluso en las nubes.



Los microorganismos existían en la Tierra miles de millones de años antes de que aparecieran las plantas y los animales y, la diversidad genética y fisiológica de la vida microbiana es inmensamente más grande que la de las plantas y los animales. Si bien los microorganismos son las formas de vida más pequeñas, en conjunto constituyen el grueso de la biomasa de la Tierra, y llevan a cabo muchas reacciones químicas necesarias para los organismos superiores. Sin los microorganismos, las formas de vida superiores no habrían aparecido nunca y no serían capaces de sobrevivir

La microbiología es una disciplina compleja dentro de las ciencias biológicas, ya que abarca múltiples áreas del conocimiento. Uno de sus objetivos principales, es estudiar a los organismos vivos microscópicos, que se encuentran en todos los ecosistemas del mundo y se relacionan con otros seres de su mismo tipo o macroscópicos, ya sea, por parasitismo, comensalismo, mutualismo, amensalismo, competencia o depredación (Harvey et al., 2008; Prescott et al., 2004). Los microorganismos, como todo ser vivo cumplen con un rol en el ecosistema, estos en particular, desarrollan los ciclos del carbono, oxígeno, nitrógeno, y azufre; se encuentran en la base de las redes tróficas; sobre todo, son parte fundamental de la biotecnología, lo que beneficia a la obtención de ingresos partir de los productos que se elaboran, como medicamentos, vacunas, alimentos, entre otros (Montaño et al., 2010).

Los microorganismos son tan variados que el estudio de estos puede ser especializado para cada grupo, es decir, que existen áreas dentro de la microbiología, como lo son, la **bacteriología**, que se encarga del estudio de las bacterias como *Escherichia coli*; la **micología**, que estudia a los hongos como *Candida albicans*; la **virología**, que se basa en el estudio de los virus (Human Alpha herpesvirus three); la **protozoología**, que estudia a los protozoarios como *Trypanosoma cruzi*; la ficología, que estudia a las algas como *Euglena gracilis*; la **parasitología**, estudia la relación de los organismos parásitos y sus huéspedes; la **inmunología**, estudia los

mecanismos y procesos de defensa del huésped contra las enfermedades (Harvey et al., 2008; Zorzi, 2020). Los microorganismos tienen diversas aplicaciones en las distintas ramas de la microbiología: En la microbiología médica se emplean a los distintos microorganismos, al tratar ciertas enfermedades se incentiva la creación de medicamentos que resultan de estudio de microorganismos, un claro ejemplo es la penicilina que fue aislada de un hongo del género *Penicillium*, y es usada en el tratamiento de las enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias; también, en la elaboración de vacunas como la vacuna contra la viruela, que contiene *Vaccinia virus* vivo, que está relacionado con *Variola virus* (virus que infecta a humanos) y proporciona inmunidad contra esta (Betancur, 2015; Martín 2018).

Por su parte, la microbiología de los alimentos, tiene como herramienta principal el uso de microorganismos para la elaboración de alimentos como el queso, el yogurt, los encurtidos, las bebidas alcohólicas, y los embutidos; para la obtención de estos, se pasa por una fermentación realizada por microorganismos como las levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Candida* y *Kluyveromyces* (Betancur, 2015; Martín 2018; Zorzi, 2020). Igualmente, en la microbiología del suelo y agua, se busca hacer uso de microorganismos para beneficio de la productividad agropecuaria. Para purificar el agua de contaminantes (plomo y cadmio) se han usado cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, a *Bifidobacterium breve*, y especies de *Propionibacterium*. Para mantener los suelos ricos en nutrientes se usan *Aspergillus* y *Penicillium* (Martín 2018; Zorzi, 2020). En conclusión, los microorganismos como lo son las bacterias, hongos microscópicos, virus, y protozoarios (más comunes), se relacionan con diversos organismos, tanto macroscópicos (animales, plantas o hongos) como microscópicos (bacterias, hongos o virus), de forma positiva y negativa, lo que contribuye a su uso biotecnológico, que resulta de gran importancia para el desarrollo de la sociedad

## Los fundamentos históricos de Microbiología

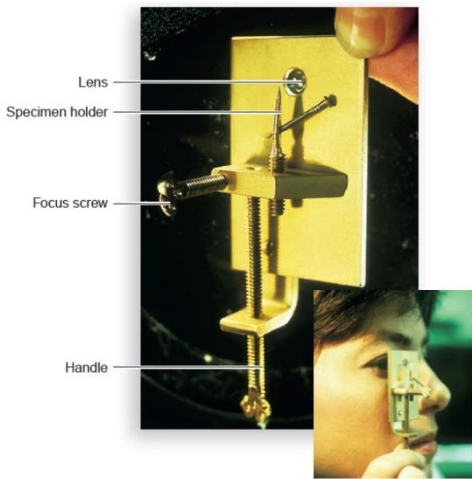
### El desarrollo del microscopio

Desde la antigüedad, los seres humanos evidenciaron que cuando ciertos alimentos se alteraban o cambiaban su estado, algunos se tornaban incomibles o incluso causaban enfermedades, mientras que otros no hacían ningún daño e incluso mejoraban su sabor. Incluso hace varios siglos, ya había una noción de que enfermedades como la peste negra y la viruela eran producidas por algún tipo de material transmisible. Pero las causas de estos fenómenos eran vagas y oscuras porque la tecnología para estudiarlos era deficiente. En consecuencia, se relacionaron con el misterio y la superstición, induciendo a algunos científicos a creer en la generación espontánea.

El conocimiento de la amplia distribución de los microorganismos y de algunas de sus características fue posible a partir del desarrollo de los primeros microscopios. Estos dispositivos revelaron microbios como entidades discretas que comparten muchas de las características de los organismos de mayor tamaño como las plantas y animales visibles. Varios científicos desarrollaron lentes de aumento, pero no tenían la amplificación necesaria para la observación de bacterias y otros organismos pequeños, unicelulares. Las primeras observaciones de microorganismos se realizaron utilizando un microscopio de lente única (simple) construido por **Antonie van Leeuwenhoek**, un holandés comerciante de telas.



Antonie van Leeuwenhoek



Leeuwenhoek construyó más de 250 microscopios pequeños y potentes que podían magnificar hasta 300 veces la muestra observada. Teniendo en cuenta que no tenía entrenamiento formal en la ciencia y que él era la primera persona en registrar fielmente este extraño y nuevo mundo, sus descripciones de las bacterias y los protozoos (que él llamó "animáculos") eran precisas. Debido a las contribuciones extraordinarias de Leeuwenhoek a la microbiología se lo considera el padre de la bacteriología y protozoología. Luego se fueron desarrollando microscopios más complejos y mejorados, con la adición de lentes pulidos, un condensador, dispositivos de enfoque más precisos, y con las fuentes de luz incorporada. El prototipo del microscopio

compuesto moderno, en uso desde aproximadamente el año 1800, era capaz de magnificaciones de 1.000 veces o más, en gran parte porque tenían dos juegos de lentes de magnificación. Incluso nuestros modernos microscopios de laboratorio no son muy diferentes en estructura básica y la función de los primeros microscopios.

### La caída de la superstición y el progreso de la Microbiología

Durante muchos de años, se consideraron a las fuerzas vitales presentes en la materia no-viviente o en descomposición responsables de la generación de organismos vivos. Esta idea antigua, conocida como la generación espontánea, fue reforzada a partir de diferentes observaciones: la carne expuesta a temperatura ambiente "producía" gusanos, los hongos "aparecían" en madera podrida, y que otros fenómenos mágicos ocurrían.

Incluso después de que se descubrieron los organismos unicelulares durante el siglo XVII, la idea de la generación espontánea continuó existiendo. Algunos científicos asumieron que los seres microscópicos fueron una etapa temprana en el desarrollo de los más complejos. Durante los siguientes 200 años, los científicos intentaron demostrar cuál de las dos hipótesis que podrían explicar el origen de las formas de vida simples era la correcta. Algunos se aferraron tenazmente a la idea de la **abiogénesis**, que apoyaba la teoría de la generación espontánea. Por otro lado, estaban los defensores de la **biogénesis**, diciendo que los seres vivos surgen sólo de otros de su misma clase. La siguiente serie de experimentos permitieron descartar la teoría abiogénesis.

Las variables importantes a considerar en el estudio de estas hipótesis fueron los efectos de los nutrientes, el aire y el calor, y la presencia de formas de vida preexistentes en el medio ambiente.

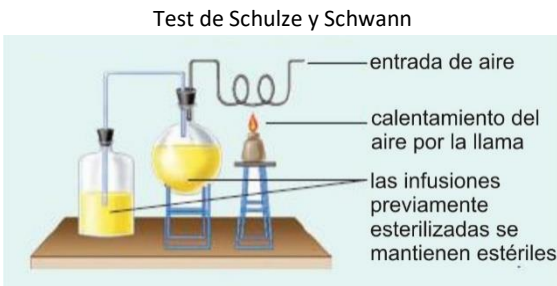
Una de las primeras personas en poner a prueba la teoría de la generación espontánea fue **Francesco Redi** (Italia). Llevó a cabo un experimento sencillo, colocó carne en dos frascos y a uno de ellos lo cubrió con una gasa fina que impedía el paso de las moscas al interior del frasco. Estos insectos pusieron sus huevos en la parte exterior de la gasa y posteriormente se evidenciaron gusanos en la parte exterior del frasco, lo que indica que son descendientes de las moscas y no surgen de alguna "fuerza vital" en la carne. Estos experimentos permitieron descartar la idea de que los organismos complejos, como por ejemplo insectos, se desarrollan a través de la abiogénesis, pero no convenció a muchos científicos de la época que los organismos más simples no podían surgir de esa manera.





El francés **Louis Joblot** intentó demostrar que los organismos microscópicos se generaban a partir de microorganismos similares, y realizó experimentos con infusiones (heno seco empapado en agua) para corroborar su hipótesis. Dividió en dos contenedores una infusión que había sido hervida para destruir cualquier ser vivo. Uno de los recipientes fue tapado para evitar el contacto con el aire y otro fue abierto permitiendo el contacto con el aire. Sólo en el vaso abierto se desarrollaron microorganismos.

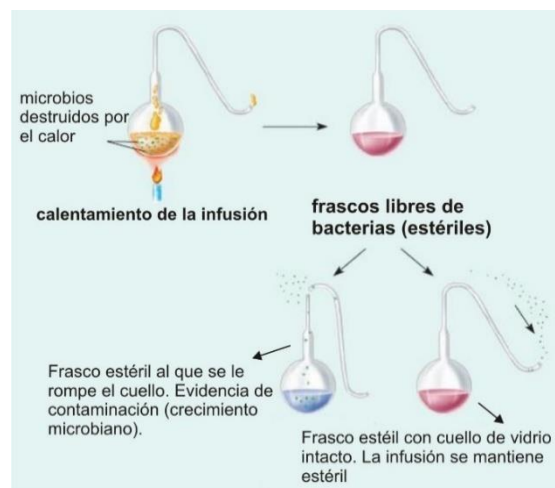
La validación de la biogénesis se frenó temporalmente por **John Needham**, un inglés que hizo experimentos similares usando caldo de cordero. Sus resultados se diferenciaron a los de Joblot porque sus dos muestras de prueba, a las cuales les aplicaba calor o no, desarrollaron microbios. Lamentablemente estos experimentos se llevaron a cabo antes de descubrir la existencia de microbios resistentes al calor que no pueden ser eliminados por mera ebullición. Aparentemente las infusiones analizadas por Joblot no presentaban este tipo de microorganismos.



**Franz Schulze y Theodor Schwann** (Alemania) plantearon como hipótesis que el aire era la fuente de microbios y trataron de demostrarlo haciendo pasar aire a través de productos químicos fuertes o tubos de vidrio calientes y finalmente tenían contacto con infusiones a las cuales previamente se les había realizado tratamiento térmico. Aunque las infusiones

no desarrollaron microorganismos, los partidarios de la abiogénesis afirmaron que el tratamiento del aire era perjudicial para el desarrollo espontáneo de la vida.

En 1860, el microbiólogo **Louis Pasteur** realizó los experimentos que terminarían descartando la teoría de la generación espontánea. Había estudiado recientemente las funciones de los microorganismos en la fermentación de la cerveza y el vino. Consideraba necesaria la acción de los microbios introducidos en la bebida a partir del aire, frutas y granos. En un informe a la Académie des Sciences de París, en 1860 (*"Expériences relatives 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, 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.



## **El desarrollo de la microbiología médica**

Para determinar las posibles fuentes de microorganismos se realizaron experimentos que demostraron que los microbios están en todas partes, no sólo en el aire y en el polvo, sino en toda la superficie de la tierra, sus aguas, y todos los objetos presentes en ella. Este descubrimiento permitió aplicaciones inmediatas en la medicina desde segunda mitad del siglo XIX, con el descubrimiento de microorganismos patógenos y el uso resultante de técnicas de esterilización, asépticas, y de cultivo puro.

### **El descubrimiento de esporas y la esterilización.**

Siguiendo el trabajo experimental de Pasteur con infusiones, el físico Inglés **John Tyndall** proporcionó la evidencia inicial de que algunos de los microbios en el polvo y el aire tienen muy alta resistencia al calor y se requiere un tratamiento particularmente vigoroso para destruirlos. Más tarde, el descubrimiento y la descripción detallada de las esporas bacterianas resistentes al calor por **Ferdinand Cohn**, un botánico alemán, permitió demostrar las causas por las cuales el calor no lograba eliminar por completo todos los microorganismos. Así surge definición de la palabra **estéril**: completamente libre de toda forma de vida, incluyendo esporas y virus. La capacidad para esterilizar objetos y materiales es una parte absolutamente esencial de la microbiología, medicina, odontología, y otras industrias.

### **El desarrollo de técnicas asépticas.**

Desde tiempos remotos, los seres humanos experimentaron una vaga sensación de que "fuerzas invisibles" o "vapores venenosos" que emanan de la materia en descomposición podrían causar enfermedades. El avance de los estudios en microbiología, a partir de los cuales lo invisible se hizo visible, el temor por los "vapores venenosos" fue reemplazado por el miedo a los "gérmenes". Los primeros estudios de **Robert Koch** (1875) claramente vincularon un organismo microscópico con una enfermedad específica. Desde entonces, los microbiólogos han llevado a cabo una búsqueda continua de agentes causantes de enfermedades.

Al mismo tiempo que la abiogénesis estaba siendo objeto de acalorados debates, unos cuantos microbiólogos empezaron a sospechar que los microorganismos pueden causar no sólo el deterioro y la decadencia, sino también las enfermedades infecciosas. Observaron que el propio cuerpo humano era una fuente de infección. **Dr. Oliver Wendell Holmes**, un médico estadounidense, observó que las madres que dieron a luz en el hogar experimentaron menos infecciones que las madres que daban a luz en el hospital, y el húngaro **Dr. Ignaz Semmelweis** demostró que las mujeres se infectaron en la sala de maternidad al ser atendidas por médicos que venían directamente de la sala de autopsias.

El cirujano inglés **Joseph Lister** fue el primero en introducir técnicas asépticas para reducir los microbios en un ambiente médico y prevenir infecciones en las heridas. Se basaba principalmente en la desinfección de las manos y el aire con productos antisépticos químicos fuertes, tales como fenol, antes de la cirugía. A finales de 1800 los cirujanos utilizaban ropa de calle en el quirófano y tenía poca idea de que el lavado de manos era importante. Las técnicas de Lister y la aplicación de calor para la esterilización se convirtieron en la base para el control microbiano mediante métodos físicos y químicos.

### **El descubrimiento de patógenos y de la teoría de los gérmenes.**

Las técnicas desarrolladas por **Louis Pasteur** (francés) y **Robert Koch** (Alemania), son utilizadas actualmente. Pasteur hizo enormes contribuciones en la utilización de microorganismos en la producción de vino y cerveza. Él ideó lo que hoy se conoce como la pasteurización y participó de los primeros estudios que muestran que algunas enfermedades humanas son consecuencia de la infección. En este mismo período Koch estableció una serie de pruebas que permitieron demostrar la relación entre un organismo patógeno y la enfermedad que causa (los postulados de Koch). En 1875 Koch utilizó un sistema experimental para demostrar que ántrax era causada por una bacteria llamada *Bacillus anthracis*.

### **Postulados de Koch:**

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.

Gracias a sus postulados se descubrieron los agentes causantes de otras 20 enfermedades entre 1875 y 1900, y aún hoy sirven como una premisa básica para el establecimiento de un enlace entre la enfermedad y el patógeno.

Numerosas tecnologías surgieron del trabajo experimental de Koch. Durante esta edad de oro de la microbiología, se inició estudio del mundo microbiano, siendo necesarios la separación de los microbios y su crecimiento en cultivo. En esta etapa se desarrollaron muchas de las técnicas que se describen a continuación: la inoculación, el aislamiento, mantenimiento de cultivos puros, y preparación de muestras para el examen microscópico.

### **El auge de la microbiología general**

Gran parte de los avances en Microbiología descritos hasta ahora se debieron a la necesidad de resolver problemas prácticos. Pero hacia finales del siglo XIX una serie de investigadores desarrollaron importantes estudios básicos que fueron revelando una enorme variedad de microorganismos y sus actividades metabólicas, así como su papel crucial en ciclos biogeoquímicos, sus relaciones con procesos de nutrición vegetal, etc.

Martinus Beijerinck (1851-1931). La mayor contribución de Beijerinck al campo de la microbiología fue su clara formulación de la técnica del cultivo de enriquecimiento. En ese tipo de cultivos, los microorganismos se aíslan de muestras naturales mediante nutrientes y condiciones de incubación muy selectivos para favorecer un grupo metabólico concreto de organismos. La habilidad de Beijerinck con el método de enriquecimiento se hizo patente en seguida cuando tras el descubrimiento de Winogradsky del proceso de fijación de nitrógeno se aisló del suelo *Azotobacter*, una bacteria aerobia fijadora de nitrógeno. Las bacterias que fijan nitrógeno pueden utilizar el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) para sintetizar importantes sustancias nitrogenadas en la célula, como aminoácidos para las proteínas y nucleótidos para los ácidos nucleicos. Con la técnica del cultivo de enriquecimiento, Beijerinck aisló los primeros cultivos puros de muchos microorganismos edáficos y acuáticos, como las bacterias reductoras de sulfato y las oxidantes de azufre, las bacterias fijadoras de nitrógeno de los nódulos radiculares, las bacterias del ácido láctico, las algas verdes, diversas bacterias anaerobias y muchos más. Además, en sus estudios clásicos de la enfermedad del mosaico del tabaco, Beijerinck utilizó filtros selectivos para demostrar que el agente infeccioso de esta enfermedad (un virus) era más pequeño que una bacteria y que, de algún modo, se incorporaba a las células de la planta hospedadora viva.

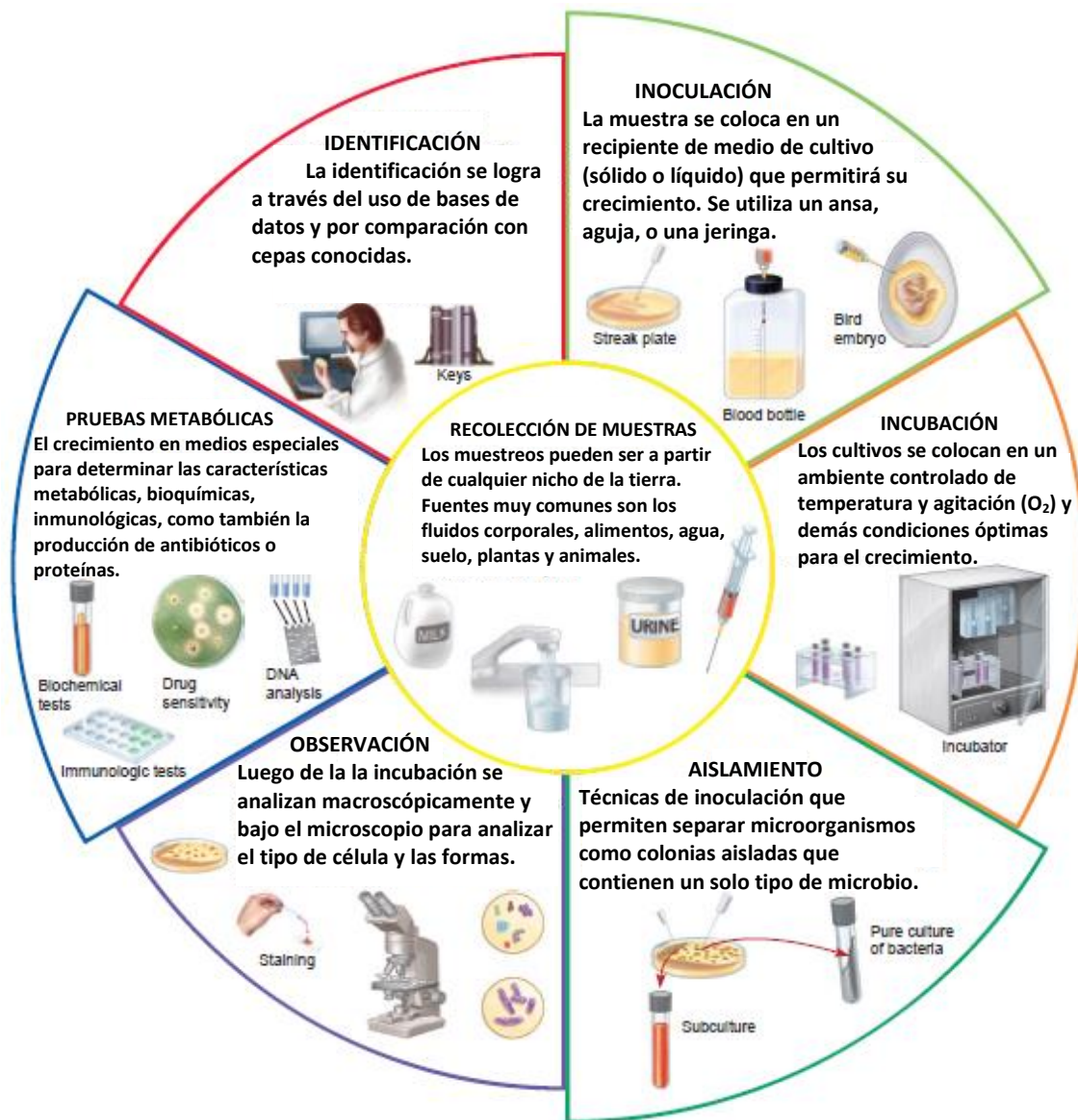
Al igual que Beijerinck, Sergei Winogradsky (1856-1953) estaba interesado en la diversidad bacteriana del suelo y del agua, y aisló con éxito diversas bacterias importantes de muestras naturales. Winogradsky estaba especialmente interesado en las bacterias que usan compuestos de nitrógeno y azufre, como las bacterias nitrificantes y las bacterias del azufre. Demostró que estas bacterias catalizan transformaciones químicas específicas en la naturaleza, y propuso el importante concepto de quimiolitotrofia, la oxidación de compuestos inorgánicos para obtener energía. Además, Winogradsky demostró que estos organismos, a los que llamó quimiolitótrofos (que quiere decir, literalmente, «comedores de tierra»), están muy extendidos en la naturaleza y obtienen el carbono del CO<sub>2</sub>. Así pues, descubrió que las bacterias quimiolitótrofas, al igual que los organismos fotosintéticos, son autótrofas. Winogradsky fue el primero en aislar una bacteria fijadora de nitrógeno, el anaerobio *Clostridium pasteurianum*, y Beijerinck se basó en este descubrimiento años después para aislar a su vez las bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias.

### **Métodos de Investigación en microbiología en la actualidad**

Los biólogos que estudian organismos complejos, tales como los animales y las plantas pueden reconocer y diferenciar su modelo de estudio utilizando sus sentidos de la vista, el olfato, el oído, e incluso tocar para detectar y evaluar diferentes características y hacer un seguimiento del crecimiento y cambios en el desarrollo. Los microbiólogos se enfrentan con problemáticas relacionadas a la naturaleza “invisible” de los organismos que estudian. En primer lugar, la mayoría de los hábitats albergan microbios en asociaciones complejas. Es por esto que es necesario separar primero los organismos entre sí para que puedan ser identificados y estudiados individualmente. En segundo lugar, para mantener y realizar un seguimiento de estos pequeños sujetos se deben cultivar en el laboratorio. Además, se es necesario controlar que los cultivos se mantengan puros (es decir con un solo tipo de microorganismo) ya que el medio ambiente es una fuente de contaminación constante. Para hacer frente a los desafíos de trabajar con microbios, los microbiólogos han desarrollado varios tipos de procedimientos y técnicas para investigar y caracterizar microorganismos. Estas técnicas pueden resumirse en seis pasos: inoculación, incubación, aislamiento, inspección, recopilación de información, e identificación. En función de los objetivos particulares de la investigación, estos pasos se pueden realizar en varias combinaciones y diferentes órdenes, pero en conjunto, sirven como las principales herramientas para el trabajo del microbiólogo. Muchos investigadores utilizan técnicas de estudio e identificación más avanzadas que puede incluso no requerir el crecimiento o el aislamiento absoluto del microbio del cultivo.

### **Inoculación, crecimiento y la identificación de los cultivos**

Para cultivar microorganismos se introduce una pequeña muestra (inóculo) en un recipiente con medio nutritivo que proporciona un entorno apropiado para el crecimiento. Este proceso se denomina inoculación. El crecimiento de los microorganismos en el medio es conocido como cultivo. El tipo de cultivo a desarrollar va a depender de los objetivos del análisis. Las muestras clínicas para determinar la causa de una enfermedad infecciosa se obtienen de fluidos del cuerpo (sangre, líquido cefalorraquídeo), descargas (esputo, orina, heces) o tejido enfermo. Las muestras sujetas a análisis microbiológico pueden incluir casi cualquier material de la naturaleza. Entre los más utilizados encontramos tierra, aguas residuales, alimentos, aire y objetos inanimados. Inicialmente se suponía que la mayoría de los microbios se podían crecer en el laboratorio dándole los medios adecuados. Actualmente se sabe que es un bajo porcentaje de microorganismos los que pueden crecerse en forma aislada en el laboratorio.



### Cuidados especiales en el trabajo de laboratorio

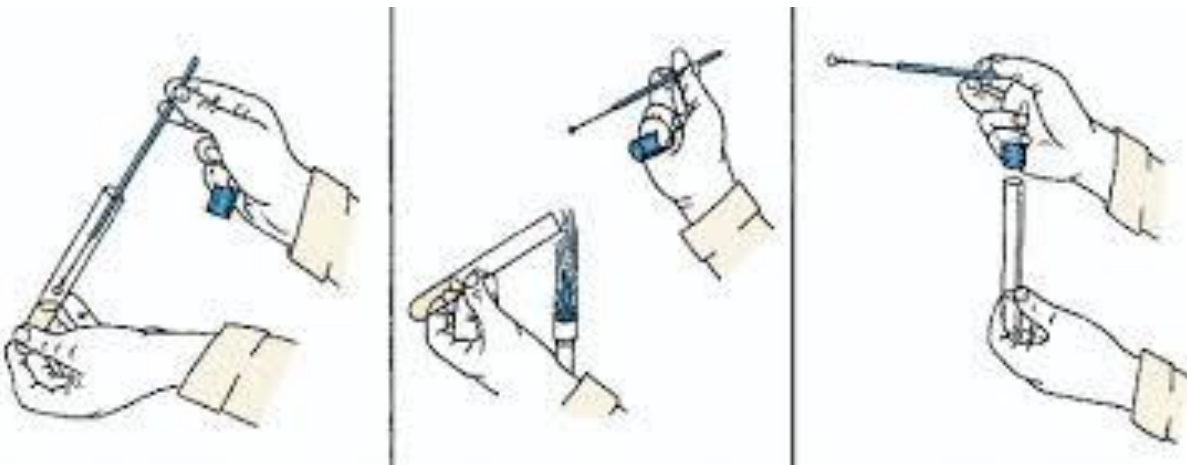
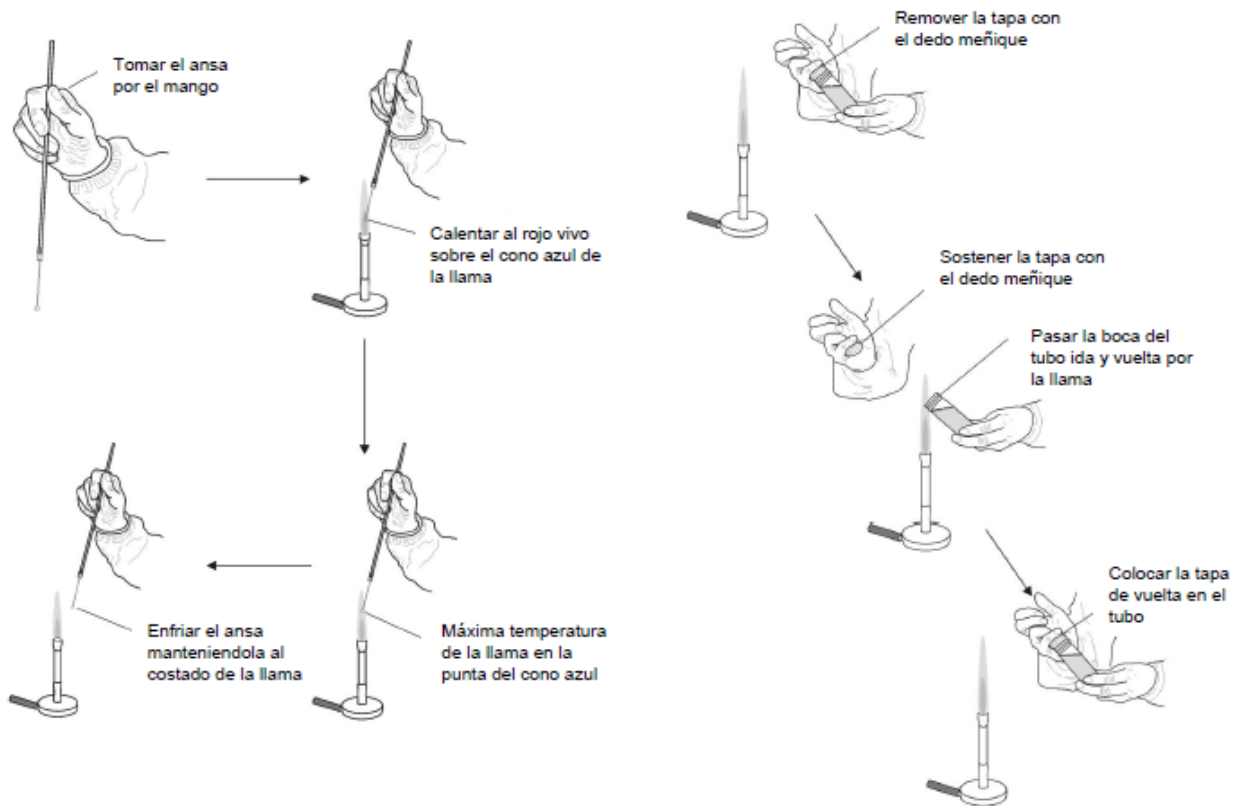
El trabajo experimental en microbiología requiere del manejo de cultivos estériles y técnicas asépticas. La contaminación es un problema constante, el uso correcto de las técnicas de esterilización y trabajo en condiciones asépticas ayudan a asegurar que sólo los microbios provenientes de la muestra de interés serán cultivados. La figura siguiente muestra cómo trabajar cerca del mechero manteniendo las condiciones asépticas del cultivo.

### Técnicas de aislamiento

En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas. Para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus propiedades, es necesario separar unos de otros. Esta técnica permite aislar y crecer individualmente cada microorganismo obteniendo así cultivos axénicos o puros. Un cultivo axénico o puro es aquel que contiene un sólo tipo de microorganismo.

La mayoría técnicas de aislamiento se basan en la obtención de colonias en medio de cultivo sólido. Las colonias son montículos discretos de microorganismos que se generan a partir de una única célula, por el crecimiento de la misma sobre soporte sólido. Debido a que surge de una sola célula, una colonia aislada consta de una sola especie microbiana. El aislamiento requiere de un

medio de cultivo sólido sobre el cual se deposite un bajo número de células, de manera que las colonias que se desarrollan se encuentren separadas. Generalmente son necesarios los siguientes materiales: un medio de cultivo sólido, una placa (placa de Petri) y herramientas de inoculación. Los cultivos puros se obtienen fácilmente si se inoculara el medio correspondiente a partir de una colonia aislada.



Las colonias aparecen distribuidas por toda la masa del agar. Aquellas que están en la superficie tendrán distintas características, dependiendo del tipo microbiano, mientras que las colonias que se desarrollan en el interior, bajo la superficie del agar, tienen forma lenticular, aunque los microorganismos que formen las distintas colonias sean de distinto tipo. Por tanto, las colonias que aparecen en la profundidad del agar son siempre biconvexas y no se diferencian unas de otras por su morfología. Aunque con esta técnica se obtienen colonias aisladas, generalmente sólo se utiliza para determinar el número de microorganismos viables en una muestra, cuando éstos son anaerobios facultativos o microaerófilos.

Después del período de incubación, en las condiciones correspondientes, las colonias aparecen sobre la superficie. Podrán diferenciarse las colonias de acuerdo a su tamaño, forma, color, textura, etc.

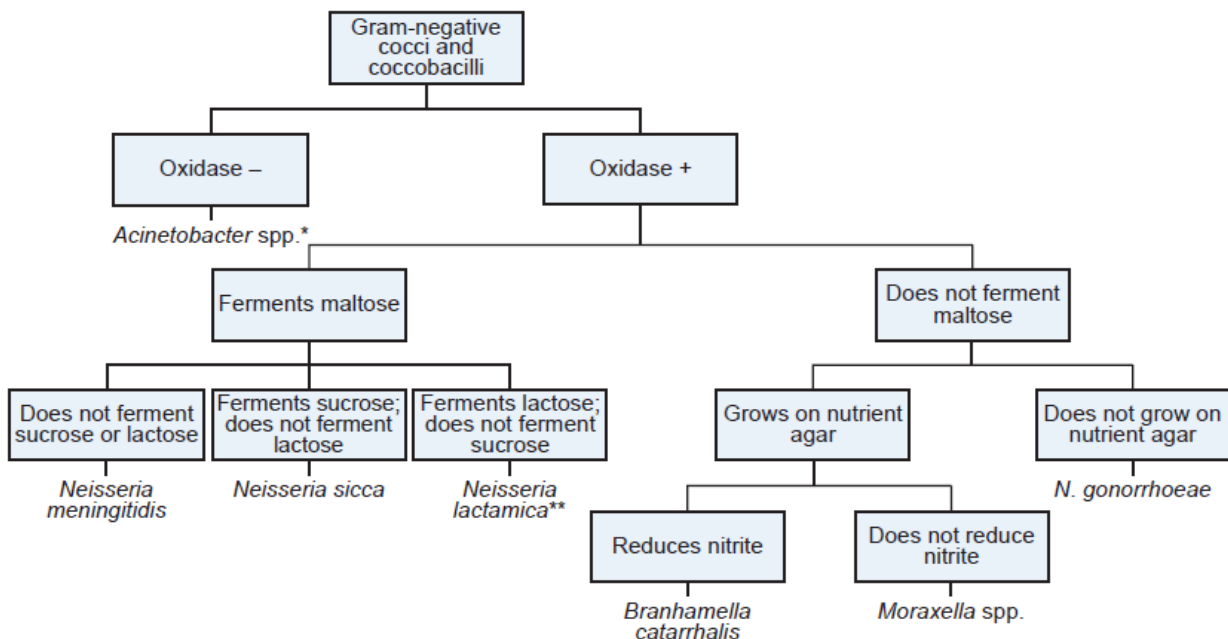
### Técnicas de identificación tradicionales

¿Cómo determinar qué tipo de microorganismos ha sido aislado a partir de la muestra en estudio? En el caso de las bacterias, a diferencia de los organismos eucariotas superiores que en muchos casos se pueden identificar a simple vista, se deben aplicar otras técnicas, algunas de las cuales caracterizan su metabolismo celular. Estos métodos, llamados pruebas bioquímicas, pueden determinar las características químicas fundamentales como requerimientos nutricionales, productos secretados durante el crecimiento, presencia de enzimas y mecanismos energéticos.



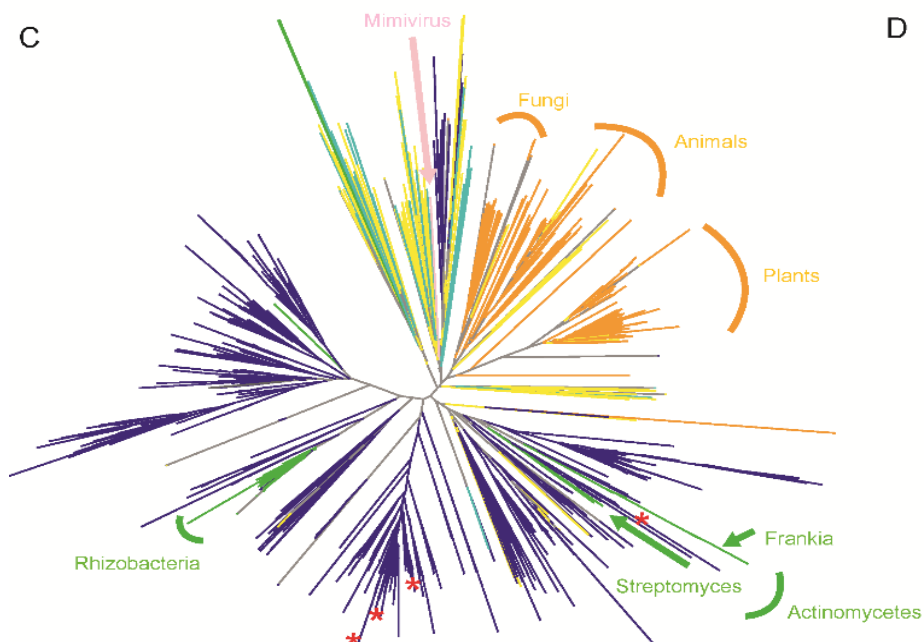
Actualmente nuevas técnicas y métodos de diagnóstico analizan las características genéticas, permitiendo identificar microbios basados en su ADN. El análisis de los perfiles de ADN resulta extremadamente específico, incluso suficiente para identificar algunos microbios. En el proceso de identificación puede completarse con pruebas inmunológicas (utilizando anticuerpos conocidos). Además, en el caso de ciertos patógenos, más información se obtiene al inocular y analizar un animal de laboratorio adecuado. Todos estos estudios a los que se suman las características macroscópicas y microscópicas permiten la clasificación del microbio. El avance tecnológico de estas técnicas de análisis metagenómico del ADN llevó recientemente al descubrimiento de otras bacterias que no había sido posible cultivarlas en el laboratorio hasta el momento.

### Esquema para la diferenciación de Cocos y Cocobacilos Gram- negativos



## Bacterias no cultivables

En 2003, un velero llamado *Sorcerer II* se embarcó en una expedición de pesca altamente inusual en el Mar de los Sargazos. Lo más llamativo de este viaje fue que no se trataba en realidad la captura de peces con anzuelos o redes. En su lugar, los objetivos eran diminutos microbios flotantes y de las profundidades. Este proyecto fue idea del Dr. Craig Venter, un investigador de la nueva era de la biotecnología, y su objetivo principal era estudiar en detalle la población microbiana del agua del océano. Los científicos a bordo del buque recogían agua de la superficie cada 200 millas, filtraban el agua para extraer el plancton microscópico (principalmente bacterias) y enviaban las muestras al laboratorio. En lugar de aislar e identificar los microbios individuales en la muestra cómo se solía hacer en el pasado, extrajeron el material genético (ADN) de las muestras, secuenciaron y analizaron los ADNs (GOS - global ocean sampling) utilizando técnicas bioinformáticas. El descubrimiento inesperado y fascinante fue que la variedad y cantidad de microbios que viven en el océano exceden con mucho los niveles encontrados en los estudios oceánicos anteriores realizados en base a aislamiento y técnicas de cultivos de laboratorio. Este ambicioso proyecto fue sólo el comienzo de varios viajes adicionales por agua y tierra y continúa hoy en todo el mundo en diferentes nichos. A pesar de que los microbiólogos habían descrito previamente alrededor de 5.700 tipos diferentes de bacterias del mar, la evidencia de estos estudios mostró que este número representa sólo una pequeña "gota en el océano". Algunos de los datos mostraron evidencia de más de 20.000 tipos diferentes de microorganismos en tan sólo un solo litro de agua de mar, la mayoría de ellos desconocidos. Según cálculos aproximados los científicos estiman que hay más microbios en la tierra que los que hay estrellas en el universo -un nonillón estimado (uno seguido de 30 ceros). Los microbios y sus comunidades constituyen el fundamento de la biosfera y sostienen la vida en la tierra.



Árbol filogenético de una proteína conservada donde se muestran en azul las ramas correspondientes a las proteínas encontradas en bacterias no cultivadas desconocidas hasta la implementación de la metagenómica.

Otra investigación hecha en océanos de todo el mundo generó base de datos de 40 millones de genes. Un equipo internacional de científicos realizó la secuenciación de millones de genes de 35.000 especies de bacterias marinas, un 80 por ciento de los cuales eran desconocidos hasta ahora, en una investigación que publicó la revista 'Science' en un número especial. Los resultados son el fruto de los miles de muestras recogidas en los océanos de todo el mundo, entre la superficie y los 900 metros de profundidad, entre el 2009 y el 2013 a bordo del velero 'Tara', en la expedición

científica 'Tara Oceans', que, según los científicos, ha permitido describir la diversidad del plancton de los océanos. En el proyecto han participado, entre otros, Científicos del Instituto de Ciencias del Mar (ICM-CSIC) de Barcelona. Según los investigadores, entre los retos futuros está determinar la función que realizan los nuevos genes descubiertos para ver qué uso potencial pueden tener en biotecnología y biomedicina. Una de las hazañas de la expedición, en la que participó un centenar de científicos de diferentes países, es, "que ha descrito la diversidad microbiana a escala global y a un nivel de resolución antes impensable, gracias al uso de la secuenciación masiva de ADN y ARN" (<https://www.embl.de/tara-oceans/start/>),

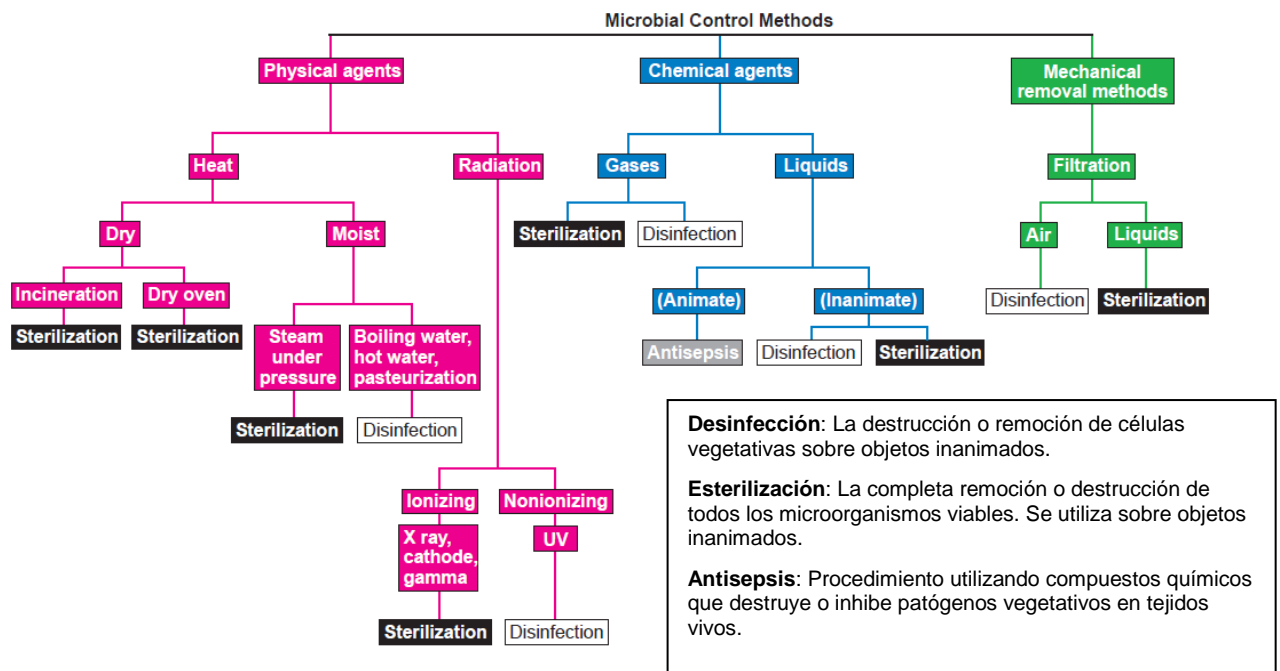
Antes de entrar de lleno en estas técnicas de laboratorio tenemos que hablar de las técnicas asépticas de laboratorio y métodos de control microbiológico que nos permitirán la manipulación adecuada de nuestras muestras de cultivo.

# Capítulo I.A

## Métodos de esterilización y desinfección

Uno de los principales problemas de los experimentos de microbiología, cuando se quiere trabajar con microorganismos puros, son los contaminantes, referidos como otros microbios presentes en el ambiente que pueden introducirse en nuestros experimentos en un momento dado.

Los métodos de descontaminación emplean agentes físicos (calor o radiaciones) o químicos (desinfectantes y antisépticos). Esta clasificación es conveniente, a pesar de que las categorías se solapan en algunos casos; por ejemplo, la radiación puede formar productos químicos dañinos y algunos productos químicos puede generar calor. El siguiente diagrama resume las principales aplicaciones para ejercer el control microbiano.



### Resistencia relativa de las formas microbianas Esto hay que verificar si es así

Los contaminantes que pueden tener efectos de largo alcance si no se controla adecuadamente incluyen células bacterianas vegetativas y endosporas, hifas de los hongos y esporas, levaduras, protozoos tanto las formas activas (trofozoítos) como los quistes, gusanos, virus y priones. Este esquema compara la resistencia general de estas formas frente a los métodos de control físicos y químicos:

#### Alta resistencia

- Priones: partículas infecciosas proteicas.
- Endosporas bacterianas: principalmente de bacterias en los géneros *Bacillus* y *Clostridium*.

#### Resistencia moderada

•Quistes de protozoarios, algunas esporas sexuales fúngicas, algunos virus. En general, los virus desnudos son más resistentes que las formas envueltas.

•Varios grupos de bacterias carecen de endosporas, pero tienen células vegetativas con una mayor resistencia a los agentes de control microbiano. Estos incluyen *Mycobacterium*, cuyas paredes celulares tienen gruesas capas de cera, que pueden bloquear la entrada de muchos desinfectantes. Las paredes celulares de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, y muchos otros bacilos Gram-negativos tienen una membrana externa que también evita la penetración de agentes

químicos. Especies de *Staphylococcus* se encuentran entre las más resistentes al calor y a los químicos de todas las bacterias debido a sus gruesas paredes de peptidoglicano protector.

#### Baja resistencia

•La mayoría de las células vegetativas bacterianas, esporas de hongos (distintas de zigosporas) e hifas, los virus con envoltura, levaduras, y trofozoítos protozoarios.

Las endosporas bacterianas tradicionalmente se han considerado las entidades microbianas más resistentes, siendo hasta 18 veces más difícil de destruir que las células vegetativas. Debido a esto el objetivo de la esterilización y control microbiano se centra en la destrucción de las mismas. Cualquier proceso que mata a las endosporas invariablemente mata a todas las formas microbianas menos resistentes. Otros métodos de control (desinfección o antisepsia) se enfocan principalmente en los microbios que son menos resistentes que las endosporas.

### **Esterilización**

La esterilización es un proceso que destruye o elimina todos los microorganismos viables, incluyendo virus. Cualquier material que ha sido sometido a este proceso se dice que "el material esta estéril mientras se lo conserve en un recipiente estanco, sellado y libre del contacto con microorganismos del ambiente".

Los métodos de control que esterilizan son generalmente empleados para los objetos inanimados, porque la esterilización de partes del cuerpo humano sería altamente peligrosa y difícil de practicar. Aunque la mayor parte de los procesos de esterilización se realizan con un agente físico tal como el calor, algunos productos químicos pueden ser clasificados como agentes esterilizantes debido a su capacidad para destruir las esporas.

A veces, la esterilización no es practicable ni necesaria, ya que sólo ciertos de microbios necesitan ser controlados. Algunos agentes antimicrobianos eliminan sólo los estados vegetativos susceptibles de los microorganismos, pero no destruyen las endosporas más resistentes. Tenga en cuenta que la destrucción de las esporas no siempre es una necesidad, porque la mayoría de las enfermedades infecciosas de los seres humanos y de los animales son causadas por microbios no formadores de esporas.

### **Agentes microbicidas**

La terminación -cida (quiere decir "matar") se puede combinar con otros términos para definir un agente antimicrobiano destinado a la destrucción de un determinado grupo de microorganismos. Por ejemplo, un bactericida es un producto químico que destruye las bacterias a excepción de los que están en la etapa de endospora. El mismo puede no ser eficaz en otros grupos microbianos. Un germicida es cualquier agente químico que mata microorganismos patógenos. Un germicida se puede utilizar en materiales inanimados (no vivientes) o en tejido vivo. Cualquier agente físico o químico que mata "gérmenes" se dice que tiene propiedades germicidas. Un agente esporicida puede destruir las endosporas bacterianas que hace que sea también un agente esterilizante. Un fungicida es una sustancia química que puede matar a las esporas de hongos, hifas y levaduras. Por otro lado, un agente antiviral es cualquier sustancia química conocida para inactivar a los virus, sobre todo en el tejido vivo.

### **Agentes microbiostáticos**

La palabra griega "estasis" significa detenido. Se pueden utilizar en combinación con varios prefijos para denotar una condición en la cual los microbios son temporalmente impedidos de multiplicarse, pero no se mueren por completo. Aunque matar o inactivar los microorganismos de forma permanente es el objetivo habitual de control microbiano, la microbiostasis tiene aplicaciones significativas. Muchos de los agentes utilizados para controlar los microorganismos en el cuerpo (antisépticos o fármacos) tienen efectos microbiostáticos debido a que algunos compuestos microbicidas pueden ser altamente tóxicos para las células humanas.

## Desinfección y antisepsia

La desinfección se refiere a la utilización de un proceso físico o un agente químico (un desinfectante) para destruir los patógenos vegetativos, pero no endosporas bacterianas. Es importante tener en cuenta que los desinfectantes se utilizan normalmente sólo en objetos inanimados, ya que en las concentraciones necesarias para ser eficaz pueden ser tóxicos para el tejido vivo. Procesos de desinfección también pueden eliminar los productos nocivos de microorganismos (toxinas) de los materiales. Ejemplos de desinfección incluyen la aplicación de una solución de 5% de cloro o lavandina a una mesa de examen, hirviendo los utensilios de comida utilizados por una persona enferma, o la inmersión de los termómetros en una solución de yodo.

En el uso moderno, septicemia se define como el crecimiento de microorganismos en la sangre y otros tejidos. La asepsia se refiere a cualquier práctica que impide la entrada de agentes infecciosos en los tejidos estériles y por lo tanto previene la infección. Las técnicas asépticas comúnmente se practican en la atención de la salud, y van desde los métodos estériles que excluyen a todos los microorganismos hasta los antisépticos. En la antisepsia, agentes químicos llamados antisépticos se aplican directamente en las superficies expuestas del cuerpo (piel y membranas mucosas), heridas e incisiones quirúrgicas para destruir o inhibir patógenos vegetativos. Ejemplos de antisepsia incluyen la preparación de la piel antes de incisiones quirúrgicas con compuestos de yodo, la limpieza de una herida con peróxido de hidrógeno, y el lavado de manos con un jabón germicida.

### Terminología del control microbiano.

Término	Definición	Ejemplo
Descontaminación	La destrucción, la eliminación o reducción del número de microorganismos indeseables.	Asepsia, desinfección, sanitización, degerminación.
Sepsis	El crecimiento de microorganismos en los tejidos.	Las heridas infectadas, infección de la sangre.
Asepsia	Las técnicas que evitan la entrada de microorganismos en los tejidos estériles.	La limpieza de la piel con yodo antes de la cirugía, el uso de agujas estériles.
Antiséptico	Productos químicos aplicados a las superficies del cuerpo que destruyen o inhiben los patógenos vegetativos.	Los yodóforos, jabones antibacteriales, clorhexidina.
Desinfección	Destrucción de patógenos vegetativos en los objetos inanimados. Alta toxicidad.	Lavandina al 5%, agua hirviendo.
Esterilización	La eliminación o destrucción de <u>todos</u> los microbios viables.	Autoclave, radiación ionizante.
Quimioterápicos	Compuestos químicos con actividad microbiocida o microbiostática con baja toxicidad como para ser administrado a un organismo superior.	Antibióticos como la ampicilina, kanamicina y cloranfenicol.

### ¿Qué es la muerte microbiana?

La muerte es un fenómeno que implica el cese definitivo de los procesos vitales de un organismo. La muerte de organismos microscópicos que se componen de una o unas pocas células es difícil de detectar, ya que a menudo no muestran signos vitales visibles. Los agentes letales (como radiaciones y sustancias químicas) no alteran necesariamente la aparición manifiesta de las células microbianas. Incluso la pérdida de movimiento en un microbio móvil no se puede utilizar como indicador de muerte. Este hecho ha provocado la necesidad de desarrollar las cualificaciones especiales que definen y delimitan la muerte microbiana.

Los efectos destructivos de agentes químicos o físicos se producen a nivel celular y molecular. Conforme una célula se expone a un agente tal como calor intenso o productos químicos tóxicos, varias estructuras celulares se rompen, y toda la célula puede sufrir daños irreversibles. En la actualidad, la forma más práctica para detectar este daño es determinar si una célula microbiana todavía puede reproducirse cuando se expone a un medio ambiente adecuado. Si el microbio ha sufrido daño metabólico o estructural hasta tal punto que ya no se puede reproducir, incluso en un entorno ideal, entonces ya no es viable. La pérdida permanente de la capacidad reproductiva,

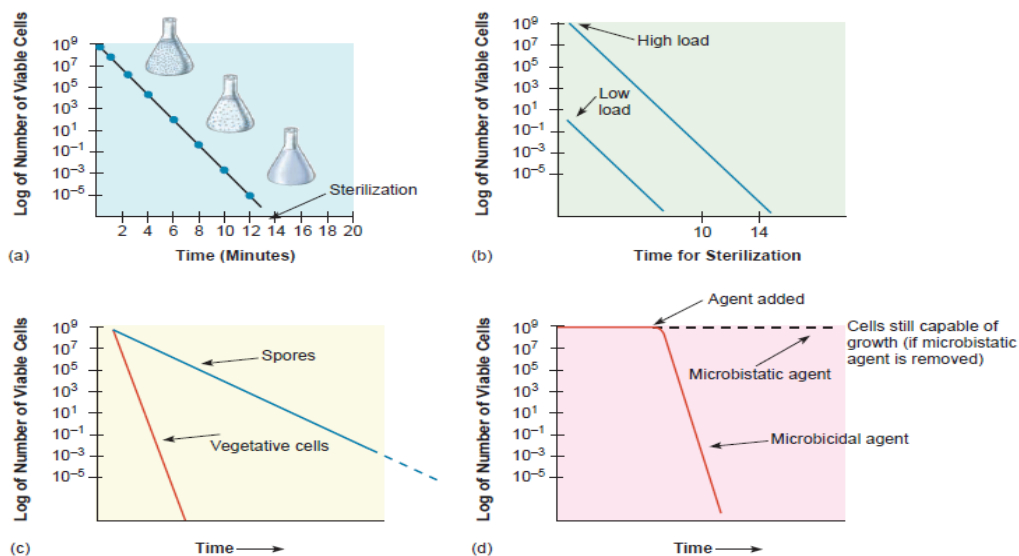
incluso bajo condiciones óptimas de crecimiento, se ha convertido en la definición microbiológica aceptada de la muerte bacteriana.

### Factores que afectan la tasa de mortalidad

La capacidad de definir la muerte microbiana tiene enorme importancia teórica y práctica. Las células de un cultivo muestran variación en la susceptibilidad a un agente microbicida dado. La muerte de toda la población no es instantánea, sino que comienza cuando se cumple un determinado umbral del agente microbicida, una combinación de tiempo y concentración. La muerte continúa de una manera logarítmica y aumenta con el tiempo de exposición. Debido a que muchos agentes microbicidas están dirigidos contra procesos metabólicos de las bacterias, las bacterias activas (más jóvenes o que se dividen rápidamente) tienden a morir más rápidamente que aquellas que están metabólicamente menos activas (de cultivos viejos o fase estacionaria). Eventualmente, se alcanza un punto en el que la supervivencia de las células es muy poco probable y este punto es equivalente a la esterilización.

La eficacia de un agente particular se rige por varios factores además del tiempo que dure el tratamiento. Estos factores adicionales influyen en la acción de los agentes antimicrobianos:

1. El número de microorganismos. Una mayor carga de contaminantes requiere más tiempo para destruirlos.
2. La naturaleza de los microorganismos en la población. En la mayoría de circunstancias reales de desinfección y esterilización, la población diana no es una sola especie de microbio sino una mezcla de bacterias, hongos, esporas y virus, que presentan un amplio espectro de resistencia microbiana.
3. La temperatura y el pH del medio ambiente.
4. La concentración (dosis o intensidad) del tratamiento del agente.



Factores que influyen en la velocidad a la cual los microbios mueren por agentes antimicrobianos. (a) Extensión de la exposición al agente. Durante la exposición al agente químico o físico, todas las células de una población microbiana, aún un cultivo puro, no mueren simultáneamente. A través del tiempo, el número remanente de organismos viables en la población decrece de manera logarítmica, dando una relación lineal. El punto en el cual el número de sobrevivientes es infinitesimalmente pequeño se considera esterilización. (b) Efecto de la carga microbiana. (c) Resistencia relativa de las esporas frente a las formas vegetativas. (d) Acción de un agente microbicida o microbistático.

5. El modo de acción del agente.

6. La presencia de disolventes, materia orgánica e inhibidores interfiriendo la acción. La saliva, sangre y heces pueden inhibir la acción de los desinfectantes.

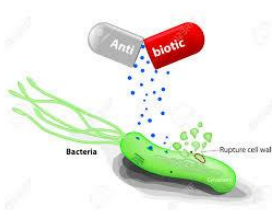
## Selección de agentes antimicrobianos

Una notable variedad de materiales y objetos requieren de la esterilización, la desinfección, y otras formas de descontaminación. Estos objetos pueden ser de materiales duraderos como vidrio, plásticos y goma hasta líquidos altamente sensibles, como el plasma sanguíneo y los tejidos humanos. A veces puede ser necesario esterilizar habitaciones enteras con sus contenidos y grandes piezas de equipo, tales como naves y satélites espaciales. No existe un método único que pueda funcionar para todos estos ejemplos. Los instrumentos dentales reutilizables están altamente contaminados con saliva, sangre y otros fluidos y tejidos. Éstas son todas las fuentes potenciales de infección, por lo que es fundamental que se puedan esterilizar entre los pacientes con un método que vaya a matar a las esporas. Debido a que están hechos principalmente de metal, los instrumentos dentales se pueden esterilizar con calor, aunque algunas formas de tratamientos de radiación y químicas también podrían utilizarse. Las clínicas generalmente optan por un método tal como esterilización por vapor que es más simple, más rápido y menos caro. Esto no funcionaría en otros tipos de instrumentos delicados tales como endoscopios, que deben ser esterilizados entre los pacientes utilizando técnicas libres de calor.

Por otro lado, ciertos suministros médicos ampliamente usados tales como jeringas de plástico y catéteres utilizados en los hospitales y clínicas son generalmente desechables y vienen ya esterilizados y empaquetados de fábrica. Puesto que están generalmente hechos de plásticos sensibles al calor, esto se hace con radiación o productos químicos penetrantes. Estos objetos no están destinados a ser reutilizados, pero también deben ser descontaminados antes de ser desechados para evitar la transmisión de enfermedades. La eliminación de esos desechos médicos está regulada por diversos organismos gubernamentales.

## Modo de acción de los agentes antimicrobianos.

El efecto adverso de un agente antimicrobiano en las células se conoce como su mecanismo de acción. Los agentes afectan a una o más dianas celulares, infligen daños progresivamente hasta que la célula ya no es viable. Los antimicrobianos tienen una gama de blancos celulares, siendo los agentes menos selectivos los que tienen una tendencia a ser más eficaces contra la más amplia gama de microbios (por ejemplo, el calor y la radiación). Los agentes más selectivos (medicamentos, por ejemplo) tienden a dirigirse a un solo componente celular y están mucho más restringidos contra los microbios sobre los que son efectivos.



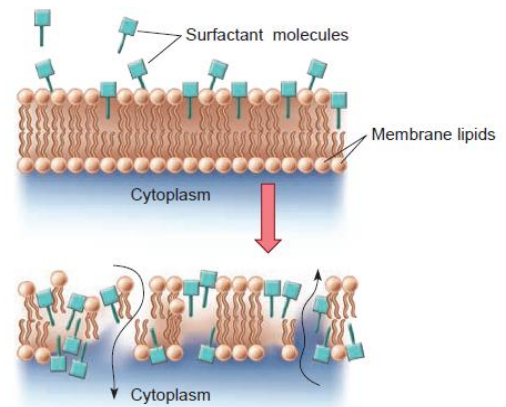
Los blancos celulares de los agentes físicos y químicos se dividen en cuatro categorías generales: (1) las paredes celulares; (2) las membranas celulares; (3) síntesis de proteínas y ácidos nucleicos; y (4) la estructura y función de proteínas.

### 1) Los efectos de los agentes sobre la pared celular

La pared celular mantiene la integridad estructural de las células bacterianas y fúngicas. Existen varios tipos de agentes químicos que dañan la pared celular mediante el bloqueo de su síntesis, la digestión, o rompiendo su superficie. Una célula privada de una pared celular funcional se vuelve frágil y se lisa con mucha facilidad. Ejemplos de este modo de acción incluyen algunos fármacos antimicrobianos (penicilinas) que interfieren con la síntesis de la pared celular en bacterias. Los detergentes y el alcohol también pueden alterar las paredes celulares, especialmente en bacterias Gram-negativas.

## 2) ¿Cómo afectan los agentes a la membrana celular?

Todos los microorganismos tienen una membrana celular compuesta de lípidos y proteínas, e incluso algunos virus tienen una envoltura exterior membranosa. Si se interrumpe esta membrana, una célula pierde su permeabilidad selectiva y tampoco puede evitar la pérdida de moléculas vitales ni evitar la entrada de productos químicos que la pueda dañar. La pérdida de esas funciones por lo general conduce a la muerte celular. Los químicos llamados surfactantes trabajan como agentes microbicidas, ya que reducen la tensión superficial de las membranas celulares. Los surfactantes son moléculas polares tales como detergentes con regiones hidrofílicas e hidrofóbicas que pueden unirse físicamente a la capa lipídica y penetrar en la región hidrofóbica interna de las membranas. En efecto, este proceso "abre" la interfaz dejando a los productos químicos nocivos que se filtren en la célula y iones importantes a filtrarse hacia fuera. Los alcoholes ejercen un efecto relacionado disolviendo los lípidos de membrana.



Modo de acción de los surfactantes sobre las membranas celulares. Los surfactantes se insertan en la bicapa lipídica, la interrumpen y crean canales anormales alterando la permeabilidad y provocando la fuga del contenido celular.

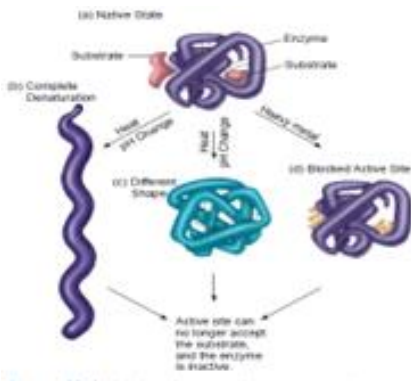
## 3) Agentes que afectan la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos

La vida de una bacteria depende del abastecimiento regular y continuo de las proteínas que funcionan como enzimas o moléculas estructurales. Cualquier sustancia química que bloquea este proceso puede afectar su función y la supervivencia de la célula. Por ejemplo, ciertos fármacos se unen a los ribosomas de las bacterias en una forma que afecta la formación de enlaces peptídicos. En su presencia, en muchas células bacterianas se inhibe la formación de proteínas requeridas en el crecimiento y el metabolismo y por lo tanto se inhibe el crecimiento celular.

Los ácidos nucleicos son igualmente necesarios para el funcionamiento continuado de los microbios. El ADN debe replicarse regularmente y debe ser transcrito en células en crecimiento, y cualquier agente que impida estos procesos o cambie el código genético es potencialmente un antimicrobiano. Algunos agentes se unen irreversiblemente al ADN, lo que impide tanto la transcripción y la traducción, mientras que otros son agentes mutagénicos. Las radiaciones gamma, ultravioleta o X causan mutaciones que dan como resultado la inactivación permanente de ADN. Los productos químicos tales como formaldehído y óxido de etileno también interfieren con la función del ADN y ARN.

## 4) Agentes que alteran la función proteica

Una célula microbiana contiene grandes cantidades de proteínas que funcionan correctamente sólo si permanecen en una configuración tridimensional normal. Las propiedades antimicrobianas de algunos agentes surgen de su capacidad para interferir en la estructura de las proteínas o desnaturalizarlas. En general, la desnaturalización se produce cuando los enlaces que mantienen la estructura secundaria y terciaria de la proteína se rompen. Una manera en que las proteínas se pueden desnaturalizar es a través de la coagulación por calor húmedo (la misma reacción se ve en la solidificación irreversible de la clara de un huevo al hervirlo). Los productos químicos tales como los alcoholes o ácidos fuertes también pueden coagular a las proteínas. Unos pocos agentes antimicrobianos, tales como iones metálicos, se unen al sitio activo de la proteína y evitan la interacción correcta con su sustrato. Independientemente del mecanismo exacto, tales pérdidas en la función normal de la proteína pueden detener rápidamente el metabolismo y ejercer efectos inhibitorios sobre todos los tipos de microbios.



Modo de acción sobre la función de proteínas. (a) El estado nativo se mantiene por enlaces que crean sitios activos. Algunos agentes desnaturalizan la proteína mediante la ruptura de los enlaces de la estructura secundaria y terciaria. Los resultados son (b) desplegado completo, o (c) plegamiento incorrecto al azar. (d) Algunos agentes reaccionan con grupos funcionales en el sitio activo interfiriendo la unión del sustrato.

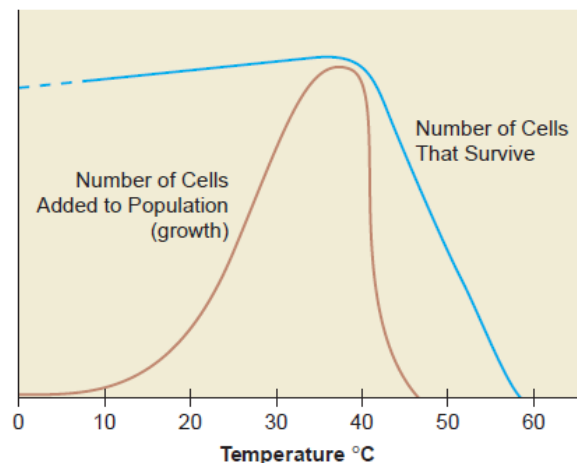
### Agentes físicos: *Calor*

Los microorganismos se han adaptado a una gran diversidad de hábitats en la tierra, incluso en condiciones severas de temperatura, humedad, presión y luz. Para los microorganismos que normalmente soportan esas condiciones físicas extremas, nuestros intentos habituales en el control probablemente tendría poco efecto. Afortunadamente para nosotros, estamos más interesados en el control de microbios que florecen en el mismo entorno en el que el ser humano vive. La gran mayoría de estos microbios se controlan fácilmente por cambios abruptos en su entorno. El calor es el agente físico más destacado. Otros agentes menos difundidos incluyen la radiación y la filtración.

### Efectos de la temperatura sobre las actividades microbianas

El efecto de temperaturas elevadas que exceden la temperatura máxima de crecimiento es microbicida, mientras que temperaturas más bajas por debajo de la temperatura mínima de crecimiento son microbiostáticas. La figura muestra gráficamente cómo los cambios de temperatura afectan el crecimiento y la supervivencia de un mesófilo típico.

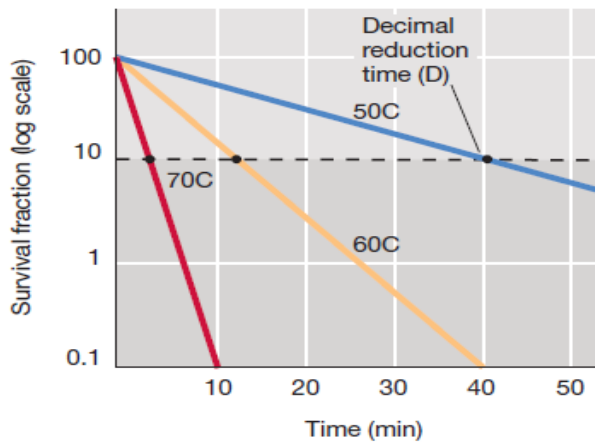
Los dos estados físicos de calor utilizados en el control microbiano son calor húmedo y calor seco. El calor húmedo se produce en forma de agua caliente, agua hirviendo o vapor de agua. En la práctica, la temperatura del calor húmedo por lo general oscila entre 60 °C a 135 °C. Como veremos más adelante, la temperatura del vapor puede ser regulada mediante el ajuste de la presión en un recipiente cerrado. El calor seco denota aire con un bajo contenido de humedad que ha sido calentado por una llama o bobina de calentamiento eléctrico. En la práctica, la temperatura del calor seco oscila entre 160 °C a varios miles de grados Celsius en el caso de la incineración.



Efectos comparativos de la temperatura sobre el crecimiento y supervivencia de un microbio mesófilo. (a) A temperatura por debajo del mínimo (10 °C), el microbio no crece (marrón) pero sobrevive (azul). (b) A temperaturas por encima del máximo (45 °C), el microbio rápidamente detiene su crecimiento y muere de manera logarítmica con el aumento de la temperatura.

### Modo de acción y eficacia relativa del calor

El calor húmedo y el calor seco difieren en sus modos de acción, así como en su eficiencia. El calor húmedo opera a temperaturas más bajas y tiempos de exposición más cortos para lograr la misma eficacia que el calor seco. Aunque muchas de las estructuras celulares son dañadas por calor húmedo, sus efectos más microbicidas son la coagulación y la desnaturalización de proteínas, que detienen rápida y permanentemente el metabolismo celular.



Efecto de la temperatura a lo largo del tiempo sobre la viabilidad de las bacterias mesófilas. El tiempo de reducción decimal, *D*, es el tiempo al cual sólo el 10% de la población original de los organismos permanecen viables a una temperatura dada. A 70°C, *D*=3 min; a 60°C, *D*=12 min; a 50°C, *D*=42 min.

El calor seco con una temperatura moderada deshidrata la célula, eliminando el agua necesaria para las reacciones metabólicas y altera la estructura de proteínas. Sin embargo, la falta de agua en realidad aumenta la estabilidad de algunas conformaciones de las proteínas, lo que exige el uso de temperaturas más altas cuando se emplea calor seco como un método de control microbiano. A temperaturas muy altas, el calor seco oxida las células y las quema a cenizas. Este método es el que se utiliza en el laboratorio para esterilizar el ansa a la llama o en la industria cuando se incinera residuos médicos.

Tratamiento	Temperatura	Tiempo para esterilizar
Calor húmedo	121 °C	15 min
	125 °C	10 min
	134 °C	3 min
Calor seco	121 °C	600 min
	140 °C	180 min
	160 °C	120 min
	170 °C	60 min

### Resistencia al calor: esporas vs. células vegetativas

Las endosporas bacterianas exhiben la mayor resistencia, y los estados vegetativos de bacterias y hongos son los menos resistentes tanto al calor húmedo como al calor seco. La destrucción de las esporas por lo general requiere temperaturas superiores a ebullición, aunque la resistencia varía ampliamente. La siguiente tabla compara algunos tiempos y temperaturas requeridas para matar formadores de esporas utilizando calor húmedo frente al calor seco:

Calor húmedo	Temp/Tiempo	Calor seco	Temp/Tiempo
<i>Bacillus subtilis</i>	121 °C/1min	<i>Bacillus subtilis</i>	121 °C/120min
<i>B. stearothermophilis</i>	121 °C/12min	<i>B. stearothermophilis</i>	121 °C/5min
<i>Clostridium botulinum</i>	120 °C/10min	<i>Clostridium botulinum</i>	120 °C/120min
<i>C. tetani</i>	105 °C/10min	<i>C. tetani</i>	100 °C/60min

En general, la muerte segura de la especie más resistente al calor de los formadores de esporas requiere 121 °C durante 20 minutos en el calor húmedo.

Las células vegetativas también varían en su sensibilidad al calor, aunque no en la misma medida que las esporas. Entre las bacterias las condiciones de mortalidad utilizando el calor húmedo varían en la gama de 50 °C durante 3 minutos (*Neisseria gonorrhoeae*) a 60 °C durante 60 minutos (*Staphylococcus aureus*). Vale la pena señalar que las células vegetativas de formadores de esporas son tan susceptibles como células vegetativas de los no formadores de esporas y que los patógenos no son ni más ni menos susceptibles que los no patógenos. Otros microbios, incluyendo hongos, protozoos y gusanos, son bastante similares en su sensibilidad al calor. Los virus pueden ser sorprendentemente resistentes al calor, con un rango de tolerancia que se extiende desde los 55 °C

durante 2 a 5 minutos (adenovirus) a 60 °C durante 600 minutos (virus de la hepatitis A). Para fines prácticos, todas las formas no resistentes al calor de bacterias, levaduras, mohos, protozoos, gusanos, y virus se destruyen por exposición a 80 °C durante 20 minutos.

### Mediciones de muerte térmica

La adecuada esterilización requiere que tanto la temperatura y la duración de la exposición sean considerados. Como regla general, las temperaturas más elevadas permiten tiempos de exposición más cortos, y temperaturas más bajas requieren tiempos de exposición más largos. Una combinación de estas dos variables constituye el **tiempo de muerte térmica (TDT, *termal death time*)**, definida como el tiempo más corto requerido para matar a todos los microbios de prueba a una temperatura especificada. La TDT se ha determinado experimentalmente para las especies microbianas que son contaminantes comunes o importantes en diversos materiales tratados térmicamente. Otra manera de comparar la susceptibilidad de los microbios al calor es el **punto de muerte térmica (TDP, *termal death point*)**, definida como la temperatura más baja requerida para matar todos los microbios en una muestra en 10 minutos.

El tratamiento térmico elegido debe hacer que el producto quede libre de agentes de deterioro o enfermedad y al mismo tiempo no se altere la calidad del producto. Por ejemplo, en la preparación comercial de alimentos en conserva, una de las mayores preocupaciones de la fábrica de conservas es prevenir el crecimiento del agente de botulismo. De varios TDTs posibles (es decir, combinaciones de tiempo y temperatura) de esporas de *Clostridium botulinum*, la fábrica de conservas debe elegir uno que mata todas las esporas, pero no altere el alimento en cuestión. Es por esto, que las fábricas de conservas comerciales calientan los alimentos de baja acidez a 121 ° C durante 30 minutos, un tratamiento que esteriliza estos alimentos.

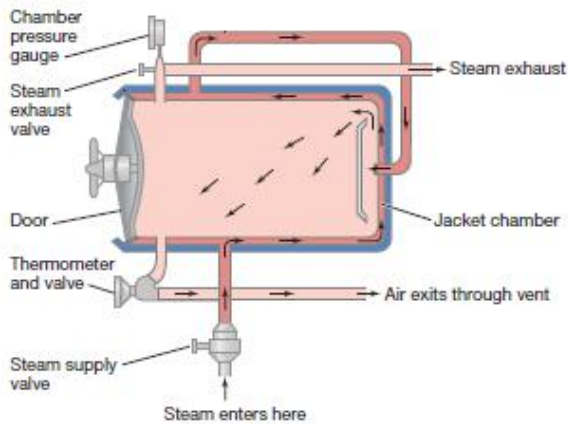
### Calor húmedo: Métodos comunes de tratamiento

Las cuatro formas en las que se emplea el calor húmedo para controlar microbios son: (1) vapor bajo presión, (2) vapor no presurizado, (3) agua hirviendo y (4) Pasteurización.

#### 1) La esterilización con vapor a presión.

A nivel del mar, la presión atmosférica normal es de 15 libras por pulgada cuadrada (psi), o 1 atmósfera. A esta presión, el agua hervirá a 100 °C y el vapor resultante permanecerá exactamente a esa temperatura, que es, por desgracia demasiado bajo para matar de forma efectiva todos los microbios. Con el fin de elevar la temperatura del vapor, la presión a la que se genera debe ser aumentada. A medida que aumenta la presión, la temperatura a la que hierve el agua y la temperatura del vapor producido también aumentan. Por ejemplo, a una presión de 20 psi (5 psi encima de lo normal), la temperatura del vapor es de 109 °C. A medida que la temperatura se aumenta a 10 psi encima de lo normal, la temperatura del vapor se eleva a 115 °C, y en 15 psi encima de lo normal (un total de 2 atmósferas), será 121 °C. No es la presión por sí misma que mata a los microbios sino el aumento de la temperatura que se produce.

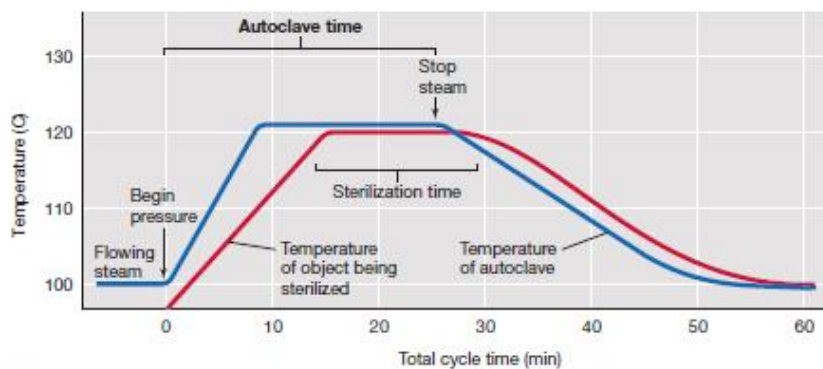
Tal combinación de presión y temperatura se puede lograr sólo con un dispositivo especial que genera vapor puro a presiones superiores a 1 atmósfera. En industrias comerciales y de salud, se utiliza el autoclave para este propósito. En el hogar un elemento doméstico comparable es la olla a presión. Los autoclaves constan de una cámara cilíndrica de metal con una puerta hermética en un extremo y canastos para sostener materiales. Su construcción incluye una compleja red de válvulas, medidores de presión y temperatura, y conductos para la regulación y medición de la presión y contención del vapor en la cámara.



(a)



(c)



Autoclave y esterilización por vapor. A) Flujo de vapor dentro del autoclave. B) Proceso de esterilización en autoclave.

La esterilización se consigue cuando el vapor puro se condensa en la cámara, aumenta la presión y gradualmente aumenta la temperatura. La experiencia ha demostrado que la combinación de temperatura y de presión más eficaz para lograr la esterilización es 15 psi, lo que da 121 °C. La duración del proceso se ajusta de acuerdo al volumen de los elementos de la carga (medios de cultivo densos o grandes frascos de líquido) y lo lleno de la cámara. La gama de tiempos de mantenimiento varía de 10 minutos para cargas ligeras a 40 minutos para los pesados o voluminosos; el tiempo promedio es de 20 minutos.

### El vapor no presurizado.

Algunas sustancias que no pueden soportar la alta temperatura de la autoclave pueden ser sometidas a esterilización intermitente, también llamada tindalización. Esta técnica requiere una cámara para contener los materiales y un depósito para agua hirviendo. Los elementos de la cámara están expuestos al vapor libre durante 30 a 60 minutos. Esta temperatura no es suficiente para matar esporas de forma efectiva, por lo que una sola exposición no es suficiente. Es por esto que luego los materiales se incuban a temperaturas apropiadas por 24 horas, para permitir que esporas sobrevivientes germinen en células vegetativas menos resistentes y luego de nuevo son sometidos a tratamiento con vapor. Este ciclo se repite durante 3 días seguidos.

### Agua de ebullición: desinfección

Un baño de agua hirviendo simple o cámara pueden descontaminar rápidamente los elementos en la clínica y el hogar. Debido a que un solo tratamiento a 100 °C no va a matar todas las células resistentes, este método puede ser utilizado sólo para la desinfección y no para la esterilización. La exposición de los materiales al agua hirviendo durante 30 minutos matará a la mayoría de los patógenos no formadoras de esporas, incluyendo especies resistentes como el bacilo de la tuberculosis y estafilococos. Probablemente, la mayor desventaja de este método es que los materiales pueden contaminarse fácilmente cuando se retiran del agua.

### La pasteurización: desinfección de bebidas y alimentos

Bebidas frescas, como la leche, los jugos de frutas, cerveza y vino se contaminan fácilmente durante la fabricación y el tratamiento. Debido a que los microbios tienen la posibilidad de echar a perder estos alimentos o causar la enfermedad, el calor se utiliza con frecuencia para reducir la carga microbiana y destruir patógenos. La pasteurización es una técnica en la que se aplica calor a

los líquidos para eliminar los agentes potenciales de infección, mientras que al mismo tiempo se favorece la retención del sabor de los alimentos.

Existen tres tipos de procesos bien diferenciados: pasteurización lenta, pasteurización a altas temperaturas durante un breve período (HTST, *High Temperature/Short Time*) y proceso a altas temperaturas (UHT, *Ultra-High Temperature*). Algunas industrias utilizan el proceso lento por lotes que mantiene la leche entre 63 a 66 °C durante 30 minutos. Otra técnica de pasteurización ampliamente utilizada es el método HTST que expone el líquido a los intercambiadores de calor a 72 °C durante 15 segundos. Este método es preferible porque es menos probable que cambie el sabor y el contenido de nutrientes, y es más eficaz contra ciertos patógenos resistentes tales como *Coxiella* y *Mycobacterium*. Aunque estos tratamientos inactivan a la mayoría de los virus y destruyen las formas vegetativas del 97% a 99% de las bacterias y hongos, no matan a las endosporas o microbios termodúricos o resistentes a temperaturas elevadas (lactobacilos en su mayoría no patógeno, micrococos, y levaduras). Por lo tanto, la leche no es estéril después de la pasteurización regular. De hecho, puede contener 20.000 microbios por mililitro o más, lo que explica por qué incluso un sache de leche sin abrir con el tiempo se echa a perder. Las nuevas técnicas también pueden producir leche parcialmente esterilizada que tiene una vida de almacenamiento más larga. Este tratamiento UHT procesa la leche con temperaturas ultra altas de 134 °C durante 2 a 5 segundos.

Un objetivo importante de la pasteurización es prevenir la transmisión de enfermedades por la leche de vacas infectadas o de los manipuladores de leche. Los objetivos principales de la pasteurización son los patógenos no formadores de esporas: especies de *Salmonella* (una causa común de infección alimentaria), *Campylobacter jejuni* (infección intestinal aguda), *Listeria monocytogenes* (listeriosis), especies de *Brucella* (fiebre ondulante), *Coxiella burnetii* (fiebre Q), *Mycobacterium bovis*, *M. tuberculosis*, y varios virus entéricos.

### **Calor seco: aire caliente y la incineración**

El calor seco no es tan versátil o ampliamente utilizado como calor húmedo, pero tiene varias aplicaciones de esterilización importantes. Las temperaturas y los tiempos empleados en calor seco varían de acuerdo con el método en particular, pero en general, son mayores que con calor húmedo.

La incineración en una llama o bobina de calefacción eléctrica es quizás el más riguroso de todos los tratamientos térmicos. La llama de un mechero Bunsen llega a 1870 °C en su punto más caliente y los hornos/incineradores operan a temperaturas de 800 a 6500 °C.

La incineración de muestras microbianas de ansas e hilos de inoculación utilizando un mechero Bunsen es una práctica muy común en el laboratorio de microbiología. Este método es rápido y eficaz, pero también es limitado a metales y materiales de vidrio resistentes al calor. El horno de aire caliente proporciona otro medio de esterilización con calor seco. El aire caliente, circulado transfiere su calor a los materiales en el horno. Dependiendo del tipo de horno y el material que se está descontaminado, un ciclo puede llevar 4 horas a temperaturas de 150 °C a 180 °C.

La siguiente tabla presenta un resumen ilustrado de la aplicación de calor para controlar microbios.

Tratamiento	Equipo / Tiempo	Usos y limitaciones
Vapor con presión	Autoclave, 121 °C, 15 psi (sobre la presión normal) 15-40 min	La esterilización de materiales resistentes al calor hechos de vidrio, tela, caucho, metal; medios de cultivos; plásticos resistentes al calor. Descontaminación de los cultivos. No es apropiado para aceites o polvos.
Tindalización	Olla, temperaturas de 80-100 °C, ciclos de 30 min por 3 días; los materiales se incuban entre los tratamientos para permitir la germinación de las endosporas.	Esterilización de algunos medios de cultivos y los alimentos que no pueden ser esterilizados en autoclave.
Pasteurización	Olla, 65 °C por 30 min (VAT), 72 °C por 15 seg (HSTS) o 134 °C por 2-5 seg (UHT)	Desinfección de leche y productos lácteos para destruir patógenos; UHT puede esterilizar con vida útil más larga. Los jugos de fruta, cerveza y el vino pueden ser pasteurizados para destruir contaminantes y preservar los productos.

Agua hirviendo	Baño de agua; 100 °C 30 minutos	Limitado a la desinfección de objetos domésticos resistentes al calor, tales como utensilios de comida, ropa, equipos de sala de enfermos, artículos de bebé, ropa de cama y agua en situaciones de emergencia. Problema con la re-contaminación durante la manipulación.
Horno seco	Cámara calentada a 150 a 180 °C durante 2 a 4 horas	Para materiales que pueden soportar altas temperaturas y la deshidratación; cristalería, metales, polvos, aceites. No es aplicable para líquidos, caucho o plásticos. Lleva mucho tiempo.
Incineración	Llama del quemador Bunsen hasta 1800 °C; incineradores infrarrojos a 800 °C. Hornos incineradores de hasta 6.500 °C.	Para esterilizar las puntas de instrumentos de inoculación; limitado a metales resistentes a alta temperatura. La eliminación permanente de los residuos de los laboratorios; la quema reduce paquetes voluminosos y basura a cenizas. Para la eliminación permanente únicamente.

### Los efectos del frío y de la deshidratación

El beneficio del tratamiento con frío es reducir la velocidad de crecimiento de los cultivos y microbios en los alimentos durante el procesamiento y almacenamiento. Hay que destacar que el frío simplemente retrasa las actividades de la mayoría de los microbios. Si bien es cierto que algunos microbios sensibles son eliminados por las bajas temperaturas, la mayoría no se ve afectados negativamente por enfriamiento gradual, refrigeración a largo plazo, o la congelación. De hecho, las temperaturas de congelación, que van desde -70°C a -135°C, proporcionan un entorno que puede preservar los cultivos de bacterias, virus y hongos durante largos períodos de tiempo. Algunas bacterias psicrófilas crecen muy lentamente, incluso a temperaturas de congelación y pueden secretar productos tóxicos. Los patógenos capaces de sobrevivir varios meses en el refrigerador son *Staphylococcus aureus*; especies de *Clostridium* (formadores de esporas); especies de *Streptococcus*; y varios tipos de levaduras, hongos y virus. Los brotes de la infección alimentaria por *Salmonella* de los alimentos refrigerados, como los helados y los huevos son testimonio de la incapacidad de las bajas temperaturas para matar eficientemente a estos patógenos.

La mayoría de las células vegetativas directamente expuestas al aire ambiente sufren un proceso gradual de deshidratación o secado. Patógenos tales como *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae* pueden morir después de unas horas de secado al aire, pero muchos otros pueden estar conservados. *Stafilococos* y *Streptococos* en las secreciones secas y el bacilo tuberculoso rodeado de esputo pueden permanecer viables en el aire y el polvo por largos períodos. Muchos virus (especialmente sin envoltura) y esporas de hongos también pueden soportar largos periodos de desecación. Endosporas de *Bacillus* y *Clostridium* son viables durante millones de años bajo condiciones extremadamente áridas. La desecación puede ser una forma valiosa para conservar los alimentos, ya que reduce en gran medida la cantidad de agua disponible para apoyar el crecimiento microbiano.

Es interesante notar que una combinación de secado por congelación o liofilización -es un método común de conservar microorganismos y otras células en un estado viable para muchos años. Los cultivos puros se congelan instantáneamente y se exponen a un vacío que elimina rápidamente el agua. Este método evita la formación de cristales de hielo que dañarían las células. Como regla general, refrigeración, congelación y desecación no debe interpretarse como métodos de desinfección o esterilización porque sus efectos antimicrobianos son erráticos e inciertos, y uno no puede estar seguro de que los patógenos sometidos a ellos han sido eliminados.

### Agentes físicos: Radiación

Otra forma en que la energía puede servir como un agente antimicrobiano es a través del uso de la radiación. La radiación se define como la energía emitida por las actividades atómicas a alta velocidad a través de la materia o el espacio. Se caracteriza por una gama de longitudes de onda conocidas como espectro electromagnético. Aunque existe la radiación en muchos estados de energía, vamos a considerar sólo los tipos adecuados para el control microbiano: rayos gamma, los rayos X y la radiación ultravioleta.

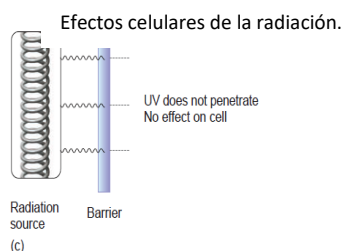
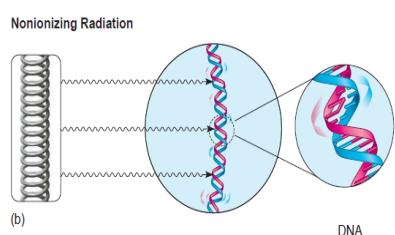
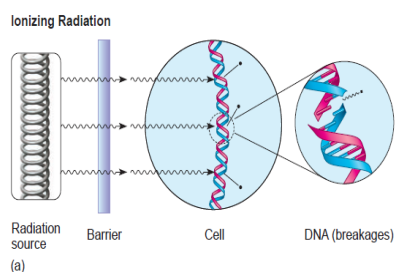
## Radiación Ionizantes vs no-ionizante

Los efectos físicos reales de la radiación sobre los microbios pueden entenderse al visualizar el proceso de irradiación, o bombardeo con radiación, en el nivel celular. Cuando una célula es bombardeada por ciertas ondas o partículas, sus moléculas absorben parte de la energía disponible dando lugar a una de dos consecuencias:

1) Si la radiación expulsa electrones orbitales de un átomo, hace que se formen iones; este tipo de radiación se denomina radiación ionizante. Uno de los blancos más sensibles de la radiación ionizante es el ADN, el cual sufrirá mutaciones en una escala amplia. Otros efectos letales secundarios pueden ser la producción de sustancias tóxicas. Los rayos gamma, rayos X y

electrones de alta velocidad son ionizantes en sus efectos.

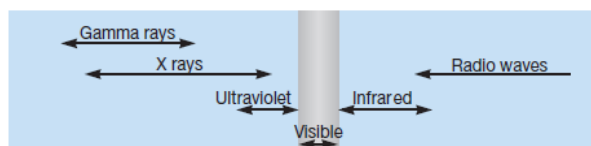
2) La radiación no ionizante, mejor ejemplificada por la radiación UV, excita los átomos al elevarlos a un estado de energía más alto, pero no los ioniza. Esta excitación atómica, a su vez, conduce a la formación de enlaces anormales dentro de las moléculas tales como el ADN y es por lo tanto mutagénica (UV-C).



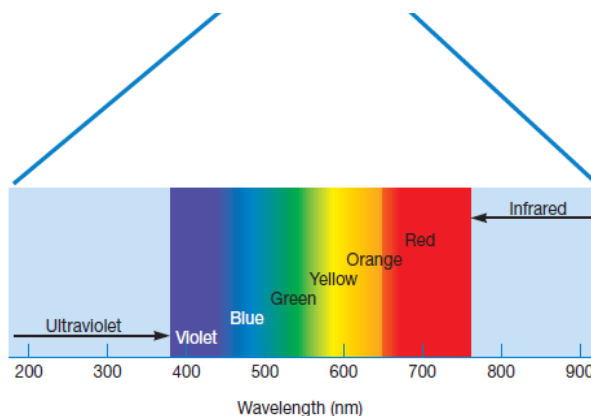
materiales se colocan en estas máquinas y se irradiaron durante un corto tiempo con una dosis cuidadosamente elegida. La dosis de radiación se mide en Grays (que ha sustituido el término más antiguo, rads). Dependiendo de la aplicación, la exposición varía de 5 a 50 kilograys (kGy; un kilogray es igual a 1,000 grays). Aunque todas las radiaciones ionizantes pueden penetrar líquidos y materiales más sólidos, los rayos gamma son más penetrantes, los rayos X son intermedios y los rayos catódicos son los menos penetrantes.

## La irradiación como un método de control microbiano

Los alimentos han sido objeto de irradiación en circunstancias limitadas durante más de 50 años. Este método se aplica tanto para harina de carne de cerdo y carne de res molida, a las frutas y verduras. La radiación se utiliza para matar no sólo las bacterias patógenas, sino también a los insectos y los gusanos e incluso inhibir el brote de patatas blancas.



Espectro electromagnético. Sólo la radiación ionizante, UV e infrarrojo tienen aplicaciones en el control microbiano.



**Figure 11.7** The electromagnetic spectrum. Waves range from the shortest gamma rays to the longest radiowaves. Inset shows the spectrum of visible light between ultraviolet (UV) and infrared. Only

La irradiación puede conducir a una pequeña disminución en la cantidad de tiamina (vitamina B1) en los alimentos, pero este cambio es lo suficientemente pequeño para ser despreciable. El proceso de irradiación produce radicales libres oxidantes, que desaparecen casi inmediatamente. Ciertos alimentos no se pueden irradiar, por ejemplo, la clara de huevo se vuelve lechosa y las semillas de alfalfa no germinan correctamente. Cabe destacar que los alimentos no se suelen dañar por el proceso de irradiación y muchos estudios, tanto en animales como en humanos, han llegado a la conclusión de que no existen efectos nocivos del consumo de alimentos irradiados.

Uno de los posibles beneficios de los alimentos irradiados tiene que ver con el control de infecciones particularmente utilizado para tratamiento de la carne de res, aves de corral, en la carne de cerdo, y la reducción de patógenos y plagas en frutas y verduras. Un beneficio adicional de la irradiación es que los microbios responsables del deterioro de los alimentos son eliminados junto con agentes patógenos, lo que lleva a un aumento de la vida útil. En cualquier caso, la comida irradiada se puede vender a los consumidores, pero con un etiquetado claro que indique el método que se ha utilizado.

La esterilización de productos médicos con radiaciones ionizantes es un campo en rápida expansión. Medicamentos, vacunas, instrumentos médicos (especialmente plásticos), y otros materiales delicados pueden ser irradiados sin dañarlos. Sus principales ventajas son la velocidad, potencia alta penetración (se puede esterilizar materiales a través de paquetes y envoltorios exteriores), y en ausencia de calor. Sus principales desventajas son posibles peligros de la exposición a la radiación y posibles daños a algunos materiales.

### La radiación no ionizante: Rayos Ultravioleta

La radiación ultravioleta (UV) se extiende en la longitud de onda de aproximadamente 100 nm a 400 nm. Es más letal de 240 nm a 280 nm. En la práctica diaria, la fuente de radiación UV es la lámpara germicida (UV-C), que genera radiación a 254 nm. Debido a su estado de menor energía, la radiación UV no es tan penetrante como la radiación ionizante. Debido a que la radiación UV pasa fácilmente a través del aire, ligeramente a través de líquidos, y sólo pobremente a través de sólidos, el objeto a desinfectar debe ser expuesto directamente a ella para un efecto completo.

Cuando la radiación UV pasa a través de una célula, es absorbida inicialmente por el ADN. El daño molecular específico se produce en las bases pirimidínicas (timina y citosina), que forman uniones anormales entre sí llamados dímeros de pirimidina. Estos enlaces se producen entre bases adyacentes en la misma cadena de ADN e interfieren con la normal replicación del ADN y la transcripción. Los resultados son la inhibición del crecimiento y la muerte celular. Además de alterar el ADN directamente, la radiación UV también altera las células mediante la generación de productos fotoquímicos tóxicos llamados radicales libres. Estas moléculas altamente reactivas interfieren con procesos celulares esenciales mediante la unión a ADN, ARN y proteínas. Los rayos ultravioletas son una herramienta poderosa para destruir células de hongos y esporas, células vegetativas bacterianas, protozoos y virus. Las esporas bacterianas son aproximadamente 10 veces más resistentes a la radiación que las células vegetativas, pero pueden ser eliminadas con el aumento del tiempo de exposición.

La radiación ultravioleta es generalmente dirigida a la desinfección en lugar de la esterilización. Lámparas germicidas pueden reducir la concentración de microbios transportados por el aire hasta en un 99%. La desinfección ultravioleta del aire ha demostrado ser eficaz en la reducción de infecciones postoperatorias, la prevención de la transmisión de infecciones por gotitas respiratorias, y restringir el crecimiento de microbios en las plantas de procesamiento de alimentos y mataderos.

Cabina de flujo laminar con luz UV en su interior.



La irradiación ultravioleta de líquidos requiere un equipo especial para esparcir el líquido que fluya en una película delgada que se expone directamente a una lámpara. Este método se puede utilizar para tratar el agua y para purificar otros líquidos (jugos de frutas o la leche) como una alternativa a calentar. Las superficies de materiales sólidos y no porosas como paredes y suelos, así como la carne, los frutos secos, los tejidos para injertos, y las drogas, pueden ser desinfectados con éxito con UV.

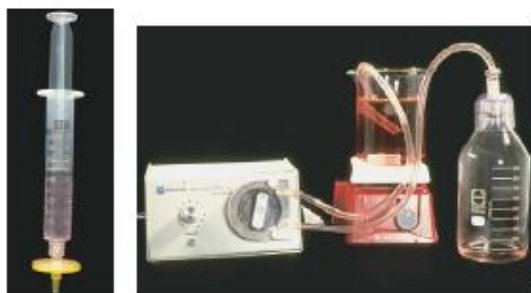
Una desventaja importante de UV es su pobre poder de penetración a través de materiales sólidos tales como vidrio, metal, tela, plástico, e incluso papel. Otro inconveniente a los rayos UV es el efecto perjudicial de la sobreexposición en tejidos humanos, incluyendo quemaduras solares, daño en la retina, cáncer y arrugas en la piel. Estos resultados dañinos ocurren sólo si una persona está expuesta directamente a los rayos UV, pero requiere la colocación de barreras para reducir esta posibilidad. La siguiente Tabla resume las aplicaciones de la radiación UV y las radiaciones ionizantes.

Radiación	Equipo/Modo de acción	Usos y limitaciones
Radiación ionizante	Radiación de cobalto emite rayos gamma; otros son los rayos X, los rayos catódicos. Los rayos fragmentan el ADN y crear bases ionizadas; altamente mutagénico.	Esterilización de productos envasados, tales como suministros médicos e instrumentos que no puede ser esterilizados por calor. Esterilización de alimentos, incluyendo frutas, lechuga y espinaca, granos, especias, carnes y comidas para llevar. Esterilización de medicamentos y vacunas. Rápido y penetrante, previene la infección y el deterioro.
Radiación no-ionizante (UV)	Lámparas germicidas o generadores establecidos para entregar los rayos UV 240-280 nm de longitud de onda; la acción crea uniones anormales entre timinas y citosinas adyacentes y produce mutaciones por delección en el ADN.	Desinfección parcial del aire, algunos líquidos y sólidos; reduce los patógenos transportados por el aire en salas de hospitales y quirófanos. Uso comercial para salas limpias, áreas de procesamiento de alimentos. Funciona en líquidos como agua, leche, medicamentos, vacunas si se expone a los rayos UV en capas delgadas. Los materiales sólidos tales como superficies de la habitación, alimentos, injertos de tejido, las drogas, y los instrumentos. La falta de penetración a través de sólidos limita las aplicaciones; la exposición directa puede ser peligrosa para los ojos y la piel.

### El uso de filtración para eliminar los microbios

La filtración es un método eficaz para eliminar microbios del aire y de líquidos. En la práctica, un fluido se filtra a través de un filtro con aberturas lo suficientemente grandes como para que pase el fluido a través, pero pequeños para atrapar los microorganismos que pasan.

La mayoría de los filtros microbiológicos modernos son membranas delgadas de acetato de celulosa, policarbonato y una variedad de materiales plásticos (Teflón, nylon) cuyo tamaño de poro puede ser cuidadosamente controlado y estandarizado. Sustancias ordinarias tales como carbón, tierra de diatomeas, o porcelana sin esmaltar también se utilizan en algunas aplicaciones. Visto al microscopio, la mayoría de los filtros están perforadas por poros muy precisos y uniformes. Los diámetros de poro varían de grueso (8 micras) hasta ultrafinos (0,02 micras), lo que permite la selección del tamaño de partícula mínimo para ser atrapado. Los que tienen diámetros de poros aún más pequeños permiten cierta esterilización para eliminar virus. La esterilización por filtrado de un líquido se realiza por la aspiración del líquido a través de un filtro estéril en un recipiente esterilizado. Estos filtros se utilizan también para separar mezclas de microorganismos y enumerar bacterias en el análisis de agua.



Filtros de membrana. Diseñados para pequeños y grandes volúmenes.

### Aplicaciones de la esterilización por filtración

La esterilización de filtración se utiliza para soluciones líquidas que no pueden soportar el calor, incluyendo suero y otros productos sanguíneos, vacunas, medicamentos, líquidos por vía

intravenosa, las enzimas, factores de crecimientos como las vitaminas y soluciones de antibióticos. La filtración ha sido empleada como un método alternativo para la esterilización de la leche y la cerveza sin alterar su sabor. También es un paso importante en la purificación del agua. Su uso se extiende a filtrar impurezas de partículas (cristales, fibras) que pueden causar reacciones graves en el cuerpo. Tiene la desventaja de no eliminar las moléculas solubles (toxinas) que pueden causar enfermedades. La filtración es también un método eficaz para la eliminación de contaminantes en el aire que son una fuente común de contaminación, por ejemplo, en la entrada de aire de un fermentador. Filtros de aire de alta eficiencia (HEPA) son ampliamente utilizados para proporcionar un flujo de aire estéril a las salas de hospitales y habitaciones estériles.

### **Agentes químicos de control microbiano**

El control químico de microbios probablemente surgió como una ciencia seria a principios de 1800, con la utilización por parte de los médicos soluciones de cloruro de calcio y yodo para tratar heridas y con el lavado de las manos antes de las cirugías.

En la actualidad, se fabrican aproximadamente 10.000 diferentes agentes químicos antimicrobianos. Probablemente 1.000 de ellos se utilizan habitualmente en los entornos de atención de salud y el hogar. Existe una necesidad real para evitar la infección y el deterioro, pero la abundancia de productos disponibles para "matar los gérmenes", "desinfectar", "antisépticos", "limpiar y desinfectar", "desodorizar", "combatir la placa," y "purificar el aire" indica una preocupación por la eliminación de los microbios del entorno que, a veces, parece excesivo.

Los productos químicos antimicrobianos pueden presentarse en estado líquido, gaseoso, o incluso sólido. Sirven como desinfectantes, antisépticos, esterilizantes (sustancias químicas que esterilizan) o conservantes (sustancias químicas que inhiben el deterioro de los materiales). En la mayoría de los casos, los productos químicos antimicrobianos sólidos o gaseosos se disuelven en agua, alcohol, o una mezcla de los dos, para producir una solución líquida.

### **La elección de un microbicida químico.**

La elección y el uso apropiado de agentes químicos antimicrobianos son una preocupación constante en la medicina y la odontología. Aunque las prácticas clínicas reales de descontaminación química varían ampliamente, algunas cualidades deseables en un germicida han sido identificadas, incluyendo:

- una acción rápida en bajas concentraciones,
- solubilidad en agua o alcohol y la estabilidad a largo plazo,
- acción microbicida de amplio espectro sin ser tóxico para los tejidos humanos y animales,
- penetración de superficies inanimadas para sostener una acción acumulativa o persistente,
- resistencia a quedar inactivados por la materia orgánica,
- no corrosivos o no mancha,
- desinfectantes y desodorizantes,
- asequibilidad y disponibilidad inmediata, y
- olor no ofensivo.

Hasta el momento, ningún producto químico puede cumplir plenamente todos esos requisitos, pero el enfoque de peróxido de hidrógeno y clorhexidina son ideales. Al mismo tiempo, debemos cuestionar las afirmaciones hechas sobre ciertos agentes comerciales, tales como enjuagues bucales y aerosoles desinfectantes de aire.

Germicidas se evalúan en términos de su eficacia en la destrucción de los microbios en los centros médicos y dentales. Los tres niveles de procedimientos de descontaminación químicos son altos, intermedios y bajos.

- Germicidas de alto nivel matan endosporas y, si se usan correctamente, son esterilizantes. Materiales que requieren control de alto nivel son equipos o dispositivos utilizados para corazón-

pulmón -por ejemplo, catéteres y los implantes, que no son esterilizables por calor y están destinados a entrar en los tejidos del cuerpo durante los procedimientos médicos.

- Germicidas de nivel intermedio matan las esporas de hongos (pero no bacterianas), los agentes patógenos resistentes, tales como el bacilo de la tuberculosis y virus. Se utilizan para desinfectar artículos (equipos respiratorios, termómetros) que entran en contacto íntimo con las membranas mucosas, pero no son invasivos.

- Los bajos niveles de desinfección eliminan sólo las bacterias vegetativas, células fúngicas vegetativas, y algunos virus. Se utilizan para materiales tales como electrodos, correas, y los muebles que tocan las superficies de la piel, pero no las membranas mucosas de limpiar.

Agente	Blancos	Nivel de actividad	Toxicidad	Comentarios
Cloro	Esporicida (lento)	Intermedio	Gas altamente tóxico; la solución irrita la piel	Inactivado por sustancias orgánicas; sensible a la luz solar.
Iodo	Esporicida (lento)	Intermedio	Puede irritar los tejidos; tóxico si es ingerido	Iodóforos son formas más suaves
Fenol	Algunas bacterias, virus y hongos	Bajo a intermedio	Puede ser absorbido por piel; puede causar daño sistema nervioso central	Baja solubilidad; caro
Clorohexidina	Mayoría de las bacterias, algunos virus y hongos	Bajo a intermedio	Baja toxicidad	De acción rápida, tiene efectos residuales
Alcoholes	Mayoría de las bacterias, virus y hongos	Intermedio	Tóxico si es ingerido; seca la piel	Inflamable; de acción rápida
Peróxido de hidrógeno	Esporicida	Alto	Tóxico para los ojos o por ingestión	Estable; trabaja sobre materiales orgánicos
Compuestos de amonio cuaternarios	Algunas bacterias, algunos virus y hongos	Bajo	Irritante de las membranas mucosas; toxico por ingestión	Soluciones débiles pueden permitir crecimiento microbiano; fácilmente inactivado
Jabones	Algunas especies muy sensibles	Muy bajo	No tóxicos	Usado para remover suciedades, aceites y residuos
Mercuriales	Débil microbiostático	Bajo	Altamente tóxico por ingestión, inhalación o absorción	Fácilmente inactivado
Nitrato de plata	Bactericida	Bajo	Tóxico, irritante	Decolora la piel
Glutaraldehido	Esporicida	Alto	Puede irritar la piel; toxico por absorción	No se inactiva por material orgánico; inestable
Formaldehido	Esporicida	Intermedio a alto	Muy irritante; carcinogénico	Baja velocidad de acción; aplicaciones limitadas
Óxido de etileno	Esporicida	Alto	Muy peligroso a los ojos y pulmón; carcinogénico	Explosivo en estado puro; penetrante; materiales deben ser aireados
Colorantes	Débil bactericida, fungicida	Bajo	Baja toxicidad	Tiñe los materiales y la piel

### Factores que afectan la actividad bactericida de agentes químicos

Como mencionamos anteriormente la eficacia de los agentes químicos depende de varios factores. Entre ellas se encuentran:

- (1) los números y tipos de microbios que están presentes,
- (2) los tipos de materiales que están siendo tratados,
- (3) el tiempo de exposición necesario, y
- (4) la fuerza y el modo de acción del agente. Aquí, nos centramos en los dos últimos por su importancia a los agentes químicos.

### Duración de la exposición

La mayoría de los compuestos requieren tiempo de contacto adecuado para que el producto químico pueda penetrar y actuar en los microbios presentes. La composición del material que está siendo tratado puede afectar enormemente este proceso. Objetos sólidos lisos se desinfectan con

mayor rapidez que los que tienen poros o cavidades. Un elemento contaminado con materia biológica común, tales como suero, sangre, saliva, pus, materia fecal u orina presenta una barrera adicional a la desinfección eficaz. Grandes cantidades de este material orgánico pueden dificultar la penetración y, en algunos casos, pueden formar enlaces que reducen la actividad de una sustancia química. La limpieza adecuada de instrumentos y otros materiales reutilizables asegurará que el germicida o esterilizante logren mejor el trabajo para el que fueron elegidos.

### La concentración del agente químico

La fuerza de un producto químico o la concentración se expresa de diversas maneras, dependiendo de la convención y el método de preparación. El contenido de muchos agentes químicos puede formularse en más de una forma. Para diluciones, un pequeño volumen del producto químico líquido (soluto) se diluye en un mayor volumen de disolvente para lograr una cierta proporción. Por ejemplo, un desinfectante fenólico común de laboratorio tal como Lysol generalmente se diluye 1:200; es decir, una parte del producto químico (soluto) ha sido añadido a 200 partes de volumen de agua (disolvente). Soluciones tales como el cloro que son eficaces en concentraciones muy diluidas se expresan en partes por millón (ppm). En las soluciones porcentuales, se añade el soluto a disolvente por peso o volumen para lograr un cierto porcentaje en la solución. El alcohol, por ejemplo, se utiliza en porcentajes que van del 50% al 95%. En general, las soluciones de baja dilución o alto porcentaje tienen más de la sustancia química activa (son más concentradas) y tienden a ser más germicidas, pero el gasto y la toxicidad potencial pueden requerir el uso de la fuerza mínima que sea eficaz.

## **Clasificación de los agentes químicos de acuerdo al blanco de acción**

### Agentes que dañan la membrana

- Detergentes
- Compuestos fenólicos
- Alcoholes

### Agentes desnaturalizantes de proteínas

- Ácidos y bases fuertes
- Ácidos orgánicos no disociables

### Agentes modificadores de grupos funcionales de proteínas y ácidos nucleicos

- Metales pesados
- Agentes oxidantes
- Colorantes
- Agentes alquilantes

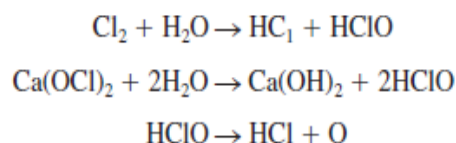
En cuanto a su estructura los agentes químicos se los puede agrupar como halógenos, compuestos fenólicos, alcoholes, oxidantes, aldehídos, gases, detergentes, y metales pesados. En la siguiente sección se agrupan estos agentes de acuerdo a sus estructuras y modos de acción.

### Compuestos halogenados

Los halógenos son flúor, bromo, cloro y yodo, un grupo de elementos no metálicos con propiedades químicas similares. A pesar de que pueden existir en la forma iónica (haluro) o estado no iónico, la mayoría de halógenos ejercen su efecto antimicrobiano principalmente en el estado no iónico. Debido a que el flúor y bromo son peligrosos de manejar y no es más eficaz que el cloro y yodo, sólo estos últimos dos se utilizan habitualmente en preparaciones germicidas. Estos elementos son componentes altamente eficaces de desinfectantes y antisépticos porque son microbicidas y esporicidas con exposición más larga. Por estas razones, los halógenos son los ingredientes activos en casi un tercio de todos los productos químicos antimicrobianos actualmente comercializados.

### El cloro y sus derivados

El cloro se ha utilizado para la desinfección y antisepsia durante aproximadamente 200 años. Las principales formas utilizadas en el control microbiano son el cloro líquido y gaseoso ( $\text{Cl}_2$ ), hipocloritos ( $\text{ClO}$ ), y las cloraminas ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ). En solución, estos compuestos se combinan con agua y liberan ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ):



Esta reacción oxida al grupo sulfhidrilo (S-H) del aminoácido cisteína y rompe los enlaces disulfuro (S-S) presentes en numerosas enzimas. Esto resulta en la desnaturalización de las enzimas interfiriendo en las reacciones metabólicas.

Los compuestos de cloro son menos eficaces y relativamente inestables si se exponen a la luz, pH alcalino, y el exceso de materia orgánica. Son ampliamente utilizado para el tratamiento del agua potable.

### El yodo y sus derivados

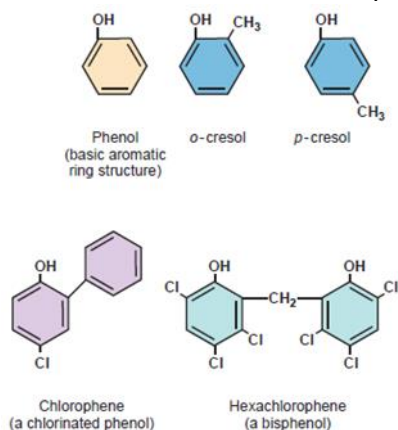
El yodo ( $\text{I}_2$ ) es un elemento que forma una solución de color marrón cuando se disuelve en agua. Penetra rápidamente las células de los microorganismos, donde perturba una variedad de funciones metabólicas al interferir con los puentes de disulfuro de las proteínas. Este modo de acción es similar a la observada con el cloro, aunque es menos susceptible a la inactivación por material orgánico. Todas las clases de microorganismos pueden ser eliminados si se utilizan tiempos de exposición y concentraciones de yodo adecuadas. Es ampliamente utilizado como desinfectante de la piel.

Compuestos halogenados	Aplicaciones	Tratamiento/cuidados
Cloro ( $\text{Cl}_2$ ), gas	Desinfección a gran escala de agua potable, alcantarillado y aguas residuales	La cloración a una concentración de 0,6 a 1,0 partes de cloro por millón de partes de agua destruye la mayoría de los patógenos vegetativos.
Hipocloritos ( $\text{HClO}$ ), lavandina	Se utiliza ampliamente en la higienización y desinfección de los equipos de alimentos, tratamiento de piscinas, spas, el agua potable y los alimentos frescos; desodorización y eliminación de manchas.	La lavandina de uso doméstico común es una solución al 5% de hipoclorito de sodio; las diluciones de 1:10 - 1:1.000 son germicidas altamente eficaces.
Cloraminas (Dicloramina, Halazone)	Una alternativa al cloro puro en el tratamiento de los suministros de agua; también como desinfectantes; para el tratamiento de heridas y superficies de la piel.	Debido a que la cloración de de agua con gas estándar se cree que produce niveles peligrosos de trihalometanos, ahora en algunos distritos se requiere utilizar cloramina para el tratamiento del suministro de agua.
Yodóforos	La mayoría usa yodo común para la piel y las membranas mucosas; preparación antiséptica para la cirugía e inyecciones; para la desinfección de equipos y superficies; para evitar infecciones por quemaduras; puede ser un preventivo para las infecciones oculares en los recién nacidos	Un complejo de yodo y un polímero de proteína neutra proporciona una liberación lenta y la reducción de la toxicidad o irritación de los tejidos; menos propenso a las manchas. Betadine es povidona yodada que contiene 2% a 10% de yodo disponible.
Tinturas	Antiséptico tópico antes de realizar cirugías; sobre la piel lesionada o quemada. Desinfección de nivel medio para los instrumentos de plástico, termómetros; forma de tabletas disponibles para la desinfección de agua contaminada.	Soluciones débiles de 1% a 3% en agua o en alcohol. Las soluciones acuosas o tinturas de 5% a 10%; algo limitado por su toxicidad y tendencia a manchar.

### El fenol y sus derivados

El fenol (ácido carbólico) es un compuesto procedente de la destilación del alquitrán de hulla o alquitrán mineral derivado del carbón. Fue antiguamente adoptado por Joseph Lister en 1867 como un germicida quirúrgico. El fenol fue el principal producto químico antimicrobiano hasta que se desarrollaron otros compuestos fenólicos con menos efectos tóxicos e irritantes. Las soluciones de fenol ahora sólo se utilizan en ciertos casos limitados, pero sigue siendo una norma con la que otros desinfectantes fenólicos están clasificados. El coeficiente de fenol compara cuantitativamente las propiedades antimicrobianas de una sustancia química a las del fenol. Los fenoles consisten en uno

o más anillos aromáticos de carbono con grupos funcionales añadidos. Entre los más importantes se encuentran los fenoles alquilados (cresoles), fenoles clorados, y bifenoles.



En altas concentraciones alteran rápidamente las paredes celulares y las membranas, y precipitan las proteínas; en concentraciones más bajas, inactivan ciertos sistemas enzimáticos críticos. Los compuestos fenólicos son fuertemente microbicidas y destruyen a las bacterias vegetativas (incluyendo el bacilo de la tuberculosis), hongos y virus (no al de la hepatitis B), pero no presentan actividad esporicida confiable. Su actividad continuada en presencia de materia orgánica y sus acciones detergentes contribuyen a su utilidad. Desafortunadamente, la toxicidad de muchos de los compuestos fenólicos los hace demasiado peligrosos para su uso como antisépticos.

### Clorhexidina

La clorhexidina es una base orgánica compleja que contiene cloro y dos anillos fenólicos. Su modo de acción afecta las membranas celulares mediante la reducción de la tensión superficial y estructura de la proteína provocando la desnaturalización. En concentraciones moderadas a altas, es bactericida para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, pero inactivo contra las esporas. Sus efectos sobre virus y hongos varían. Posee ventajas sobre muchos otros antisépticos debido a su baja toxicidad, y la acción rápida, y no se absorbe en los tejidos más profundos. Es el limpiador antiséptico de elección para controlar los brotes de *Staphylococcus* y *Acinetobacter* en los hospitales.

Compuestos fenólicos	Aplicación	Tratamiento/cuidados
Lysol y creolina	Versiones domésticas comunes de fenol; para niveles bajos o intermedios de la desinfección en el hospital	1% a 3% emulsiones que se combinan con jabón; puede ser demasiado tóxico para la antisepsia; tienden a ser absorbidos por las membranas en la sangre
Bifenoles	Ampliamente utilizado comercialmente, clínicamente, y en el hogar	Ortofenil-fenol es el principal ingrediente de aerosoles desinfectantes.
Hexaclorofeno	Fue ampliamente usado en jabones de limpieza para el hospital y el hogar. Ahora, en ocasiones se utiliza para controlar los brotes de infecciones de la piel	Hexaclorofeno es absorbido por la piel y una causa de daño neurológico. Solo disponible con receta médica.
Triclosan	Compuesto antibacteriano utilizado ampliamente añadido a jabones, cosméticos y muchos otros productos para el hogar	Actúa como desinfectante y antiséptico con efecto de amplio espectro.
Clorhexidina	Soluciones alcohólicas o acuosas ahora se utilizan comúnmente para el lavado de las manos, la preparación de los sitios de la piel para incisiones quirúrgicas e inyecciones, y el lavado de todo el cuerpo.	Complejo de base que contiene cloro y dos anillos fenólicos; el modo de acción se dirige a las membranas celulares y estructura de la proteína. En concentraciones moderadas a altas destruye bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, pero no esporas. Puede ser fungicida y virucida. Es más suave y menos tóxicos que los compuestos fenólicos y no se absorbe en la piel.

### Alcoholes como agentes antimicrobianos

Los alcoholes son hidrocarburos incoloros con uno o más grupos funcionales OH. De varios alcoholes disponibles, solamente etílico e isopropílico son adecuados para el control microbiano. Los alcoholes se emplean solo en soluciones acuosas o como disolventes para tinturas (como yodo). El mecanismo de acción de alcohol depende en parte de su concentración. Las concentraciones de 50-70% son más efectivas ya que disuelven los lípidos de membrana, afectan la tensión superficial y la integridad de las membranas. También puede desnaturalizar las proteínas una vez que penetró las membranas, pero sólo en soluciones de alcohol-agua de 50% a 95%. Debido a que el agua es necesaria para que las proteínas se coagulen, el alcohol muestra una mayor actividad microbicida a

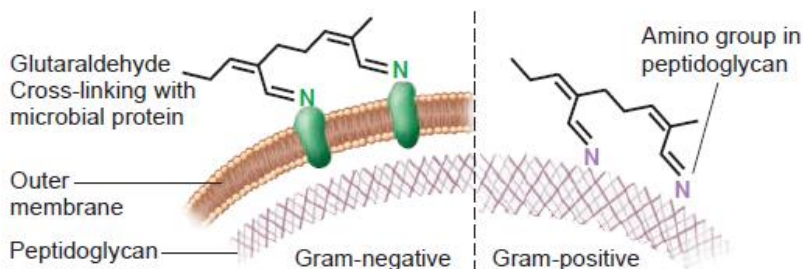
una concentración del 70% (es decir, 30% de agua) que al 100%. El alcohol absoluto (100%) deshidrata las células e inhibe su crecimiento, pero en general no es un coagulante de proteínas. El alcohol tiene efecto germicida pero no destruye las esporas bacterianas. El alcohol es activo contra las formas vegetativas resistentes, incluyendo bacterias de la tuberculosis y las esporas de hongos, siempre que el tiempo de exposición sea adecuado. El alcohol tiende a inactivar virus envueltos con más facilidad que virus sin cubierta tales como virus de la polio y la hepatitis A.

### Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es un líquido incoloro, cáustico que se descompone en presencia de la luz, metales, o catalasa y peroxidasa. Los efectos germicidas de peróxido de hidrógeno se deben a las acciones directas e indirectas del oxígeno. El oxígeno forma el radical libre hidroxilo ( $\cdot OH$ ), que al igual que el radical superóxido, son altamente tóxicos y reactivos a las células. Su uso ha disminuido debido a que la mayoría de las células microbianas producen catalasa para inactivar el peróxido de hidrógeno metabólico, aunque no puede neutralizar la cantidad de peróxido de hidrógeno que entra en la célula. El peróxido de hidrógeno es bactericida, virucida, fungicida, y en concentraciones más altas, esporicida. Actualmente se lo utiliza en la desinfección de lentes blandas, superficies inertes y equipos quirúrgicos dejándolo actuar un tiempo necesario.

Agente	Aplicación	Tratamiento/cuidados
Alcohol etílico	Agente de eliminación de gérmenes de la piel; acción surfactante elimina grasa en la piel, suciedad y algunos microbios de las capas profundas de la piel	Soluciones de 70% a 95% son germicida, de bajo costo, no irritante; una limitación es su velocidad de evaporación. Los productos necesitan ser limpiados primero y luego empapado en alcohol durante 15 a 20 minutos.
Alcohol isopropílico	Alguna desinfección de objetos, superficies; limpieza de la piel limitada	Buen microbicida y menos costoso que el etanol, pero estos beneficios deben sopesarse contra su toxicidad; la inhalación de sus vapores puede afectar el sistema nervioso.
Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )	Versátil utilizado como antiséptico, incluyendo la piel y la limpieza de heridas, cuidado de escaras y limpieza bucal; desinfectante para lentes blandas de contacto, implantes quirúrgicos, plásticos, ropa de cama, y los interiores de las habitaciones	Peróxido de hidrógeno al 3% (forma más común) es útil en el tratamiento de infecciones por bacterias anaeróbicas debido a los efectos letales del oxígeno liberado.
$H_2O_2$ esterilización	$H_2O_2$ vaporizado es un tipo importante de esterilizante; esterilizadores de plasma de peróxido de hidrógeno se utilizan para piezas industriales o artículos médicos; para aisladores, habitaciones limpias, y vehículos espaciales.	El peróxido de hidrógeno (35%) penetra en instrumentos médicos delicados, mata a los microbios más resistentes, y no corroe piezas pequeñas; los vapores son esporicidas.
Ácido peracético	Se utiliza para esterilizar habitaciones, naves espaciales; descontaminación de grandes áreas	Agente oxidante - acciones similares al peróxido de hidrógeno
Ozono ( $O_3$ )	Para la desinfección del aire, el agua, acondicionadores de aire industriales, y torres de refrigeración	Difícil de manejar

### Aldehídos como agentes esterilizantes y desinfectantes



Acción del glutaraldehído sobre la pared celular de células Gram-negativas y Gram-positivas. La molécula polimeriza fácilmente. Cuando estos polímeros reaccionan con los grupos amino (N) de los amino ácidos, croslinkan e inactivan a las proteínas.

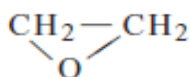
Los dos aldehídos utilizados con mayor frecuencia en el control microbiano son glutaraldehído y formaldehído. El glutaraldehído es menos tóxico y más potente que el formaldehído. El mecanismo de acción implica la alquilación de proteínas y ácidos nucleicos. Dos grupos aldehído de la molécula favorecen la formación de hidroximetilaciones y condensaciones (entrecruzamiento) con la formación de polímeros. En este proceso, los aminoácidos son alquilado, lo que significa que un átomo de hidrógeno en un

aminoácido se sustituye por la molécula de glutaraldehído. También se puede interrumpir de forma irreversible la actividad de enzimas dentro de las células. El glutaraldehído es de amplio espectro, mata a las esporas, hongos y bacterias vegetativas (incluso *Mycobacterium* y *Pseudomonas*). Los virus, incluyendo las formas más resistentes, son inactivados después de tiempos de exposición relativamente cortos. Un dispositivo especial similar a un autoclave se utiliza para aplicar una solución vaporizada bajo presión para esterilizar los instrumentos (instrumental quirúrgico) delicados sin calor. El glutaraldehído conserva su potencia incluso en presencia de materia orgánica, no es corrosivo, no daña los plásticos, y es menos tóxico o irritante que el formaldehído. Su principal desventaja es que es algo inestable, especialmente con el aumento de pH y temperatura.

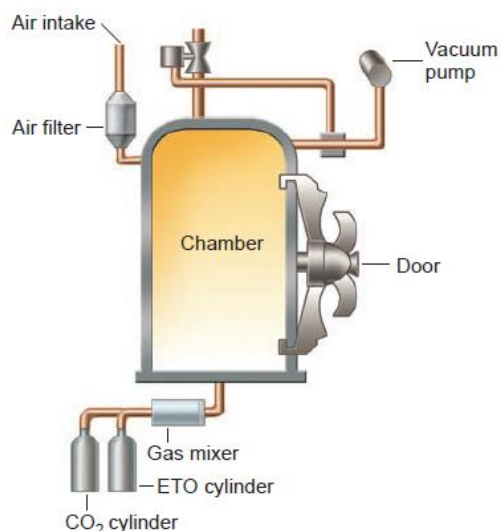
El formaldehído es un gas irritante que se disuelve fácilmente en agua para formar una solución acuosa llamada formalina. Formalina pura es una solución al 35% de formaldehído gaseoso disuelto en agua. El producto químico es microbicida a través de su unión a los ácidos nucleicos y los grupos funcionales de los aminoácidos. La formalina es un intermedio de desinfectante de alto nivel, pero su extrema toxicidad (es clasificado como carcinógeno) y los efectos irritantes sobre la piel y membranas mucosas limitar en gran medida su utilidad clínica.

### Óxido de Etileno

El procesamiento de sustancias inanimadas con vapores químicos, gases y aerosoles ofrece una alternativa versátil al calor o productos químicos líquidos. Actualmente, los vapores y aerosoles que tienen las aplicaciones más amplias son óxido de etileno (ETO), óxido de propileno, y dióxido de cloro. El óxido de etileno es una sustancia incolora que existe como un gas a temperatura ambiente. Su estructura se muestra aquí:



Al igual que los aldehídos, el ETO es un agente alquilante muy fuerte, y reacciona vigorosamente con grupos funcionales de ADN y las proteínas. A través de estas acciones, que bloquea tanto la replicación del ADN y las reacciones enzimáticas. El óxido de etileno es uno de los gases generalmente aceptados para la esterilización química, ya que, cuando se emplea de acuerdo con procedimientos estrictos, es esporicida. Un esterilizador ETO especialmente diseñado está equipado con una cámara cerrada, puertos de gas, temperatura, la presión y humedad controlada. El óxido de etileno es bien penetrante, pero de acción lenta, lo que requiere de 90 minutos a 3 horas. Algunos artículos absorben los residuos de ETO y deben ser aireados con aire estéril durante varias horas después de la exposición a eliminar la mayor cantidad de gas residual posible. Su explosividad hace que sea peligroso de manejar; puede dañar los pulmones, los ojos y las membranas mucosas si entra en contacto directo; y que está clasificado como cancerígeno por el gobierno.



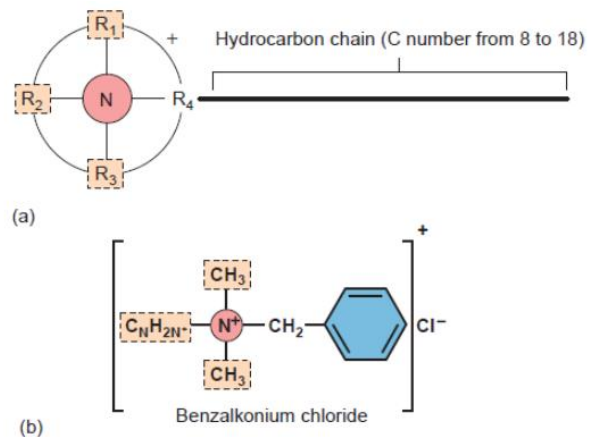
Esterilización utilizando óxido de etileno. El equipo consta de suministro de gases, ETO y CO<sub>2</sub>, una cámara para contener el material y un mecanismo para evacuar los gases e introducir aire.

Agentes alquilantes	Aplicación	Tratamiento/cuidados
Glutaraldehído	Un esterilizante para los materiales sensible al calor. Los ejemplos incluyen equipos de terapia respiratoria, pinzas hemostáticas, endoscopios de fibra óptica, equipos de diálisis renal y los instrumentos dentales	Soluciones diluidas al 2% requieren 2-4 horas de remojo. La esterilización de instrumentos implica limpieza previa, junto con autoclave para inactivar la hepatitis B y otros virus de transmisión sanguínea.
Formalina	Usos limitados como desinfectante para instrumentos quirúrgicos; utilizado en la acuicultura para matar los parásitos de peces y controlar el	Puede ser utilizado como una tintura al 8%; objetos destinados al contacto con el cuerpo deben ser

	crecimiento de algas y hongos; un ingrediente activo en líquido de embalsamar (con un alcohol y un fenol).	enjuagados a fondo para eliminar el residuo de formalina, que es tóxico y cancerígeno.
Óxido de etileno	Un esterilizante oficial para plásticos sensibles al calor y delicados instrumentos en hospitales e Industrias. Utilizado para suministros médicos preenvasados y placas de Petri desechables; utilizado ampliamente para desinfectar alimentos, especias, frutos secos, y drogas	Es un gas explosivo y debe ser utilizado con un estabilizador; es bastante tóxico para los humanos; penetrante pero lento, que requiere 1-3 horas de exposición dentro de una cámara especial

### Detergentes y jabones

Los detergentes son moléculas polares que actúan como agentes tensioactivos que dañan la integridad estructural de las membranas de modo que interfieren con su función. O sea, ejerciendo un efecto neto de interferencia con procesos de transporte y metabolismo energético y permitiendo la salida de pequeñas moléculas de la célula. Los detergentes sintéticos, al igual que los jabones, contienen una porción hidrofóbica (normalmente una larga cadena lipófila) y una porción hidrófila (un grupo polar), lo cual les permite formar micelas en solución acuosa, así como formar capas que cubren y solubilizan moléculas hidrófobas. Según sea la porción hidrófila, los detergentes se pueden clasificar en detergentes iónicos (catiónicos con carga positiva, o aniónicos con carga negativa) o no iónicos (no suelen tener actividad antimicrobiana).



Estructura de los detergentes. (a) En general, son moléculas polares con una cabeza cargada positivamente y al menos una cadena larga hidrocarbonada, sin carga. La cabeza contiene un núcleo central nitrogenado con varios grupos alquilo (R) unidos. (b) Cloruro de benzalconio, un detergente de amonio cuaternario.

### Detergentes catiónicos

Son los detergentes más potentes en cuanto a su actividad desinfectante, siendo activos contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, En bajas concentraciones, exhiben efectos solamente microbistáticos y son ineficientes contra la bacteria de la tuberculosis, virus de la hepatitis, *Pseudomonas*, y las esporas a cualquier concentración. Los principales son los llamados compuestos de amonio cuaternario. La porción hidrófoba penetra en las membranas, mientras que el grupo polar catiónico se asocia con los fosfatos de los fosfolípidos, provocando alteraciones en dichas membranas, reflejadas en la pérdida de su semi-permeabilidad, con salida de metabolitos de N y P desde el citosol. Es entonces cuando el detergente puede entrar al interior celular, con un efecto secundario de desnaturalización de proteínas. Su actividad se mejora a pH alcalino. Son rápidamente bactericidas a concentraciones muy bajas (del orden de una parte por millón, 1 ppm), siempre que en el material a tratar no exista materia orgánica. Tienen baja toxicidad, por lo que se pueden emplear como desinfectantes y antisépticos de la piel. Se emplean igualmente en la desinfección de material de industrias alimentarias.

### Detergentes aniónicos

Pueden presentar grupos carboxilos como porción hidrófila (jabones, saponinas, sales biliares, ácidos grasos dissociables) o sulfatos (dodecilsulfato sódico (SDS) también llamados laurilsulfato sódico, sulfonato de alquilbenceno). Provocan una gran disrupción de membranas, con efectos de lisis. Son activos sobre todo a pH ácido, preferentemente sobre bacterias Gram-positivas, pero poco sobre Gram-negativas, ya que éstas quedan más protegidas por la barrera del lipopolisacárido de la membrana externa. Los jabones funcionan principalmente como productos de limpieza y desinfectantes en la industria, el hogar y el entorno médico. Cepillar enérgicamente las manos con jabón germicida durante un período de 15 segundos es una manera eficaz para eliminar la suciedad,

el aceite y contaminantes de la superficie, así como algunos microbios residentes, pero es incapaz de eliminar la microbiota de la piel. Cuando los detergentes aniónicos se combinan con ácidos, se logran desinfectantes sanitarios muy potentes (debido al efecto sinérgico de ambos componentes) y de rápida acción (unos 30 segundos).

#### Detergentes no iónicos

No tienen actividad antimicrobiana, pero algunos tienen empleo en otros campos de la Microbiología: los ésteres del ácido oleico pueden adicionarse a medios de cultivo para evitar la formación de grumos y favorecer el crecimiento disperso de ciertas bacterias (como *Mycobacterium tuberculosis*); además el oleico puede estimular el crecimiento.

Detergentes	Aplicaciones	Tratamiento/cuidados
Compuestos de amonio cuaternario	Mezclado con agentes de limpieza para desinfectar y esterilizar suelos, superficies de los equipos y los baños; para desinfectar los utensilios de restaurante, equipo de procesamiento de alimentos y ropa; conservantes comunes en soluciones oftálmicas y cosméticos	En diluciones que van desde 1:100 a 1:1000; el nivel de desinfección es demasiado baja para la desinfección de instrumentos médicos.
Jabones	Agentes desinfectantes para la limpieza de la industria y el hogar; la elaboración de instrumentos para la esterilización de calor; piel de los pacientes, el lavado de manos rutinario por el personal médico y dental, lavado quirúrgico de las manos y el preoperatorio	Sales alcalinas de ácidos grasos; germicidas débiles con espuma superior y propiedades humectantes; puede eliminar grandes cantidades de suciedad superficial, grasa y otros desechos; productos químicos antimicrobianos añadidos a hacer jabones germicidas con mayor poder de desinfección

#### Metales Pesados

Varias formas de los elementos metálicos de mercurio, plata, oro, cobre, arsénico, zinc se han aplicado en el control microbiano durante varios siglos. Estos se refieren a menudo como metales pesados debido a su relativamente alto peso atómico. Sin embargo, de esta lista, sólo los preparados que contienen mercurio y la plata o cobre siguen teniendo algún uso como germicidas. Los metales de mayor peso molecular (mercurio, plata, oro) pueden ser muy tóxicos, incluso en pequeñas cantidades (partes por millón). Esta propiedad de tener efectos antimicrobianos en muy pequeñas cantidades se llama una acción oligodinámico. Germicidas de metales pesados contienen ya sea una sal metálica inorgánica u orgánica, vienen en forma de soluciones acuosas, tinturas, ungüentos, o jabones.

El mercurio, plata y la mayoría de los otros metales ejercen efectos microbicidas uniéndose a grupos funcionales de las proteínas y provocando la inactivación de ellos, con lo que el metabolismo rápidamente se frena. Este modo de acción puede destruir muchos tipos de microbios, incluyendo bacterias vegetativas, células de hongos y las esporas, algas, protozoos y virus (pero no endosporas).

Desafortunadamente, hay varios inconvenientes en la utilización de metales en el control microbiano: los metales son muy tóxicos para los humanos si se ingiere, inhala o absorbe a través de la piel, incluso en pequeñas cantidades, por las mismas razones por las que son tóxicas para las células microbianas; comúnmente causan reacciones alérgicas; grandes cantidades de fluidos biológicos y residuos neutralizan sus acciones; microbios pueden desarrollar resistencia a los metales.

Compuestos orgánicos de mercurio como el Mercurocromo, la Mercromina o el Mertiolate no son totalmente fiables como desinfectantes y presentan cierta (aunque baja) toxicidad, pero se emplean mucho como antisépticos de la piel y de heridas.

Ya sea en forma de sales solubles, o en preparaciones coloidales, los compuestos de plata se usan ampliamente como antisépticos, aunque están restringidos al tener efectos irritantes y cáusticos. Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) es bactericida frente al gonococo (*Neisseria gonorrhoeae*), y por ello se usa habitualmente para prevenir la oftalmia gonocócica del recién nacido. En los coloides orgánicos de plata los iones  $\text{Ag}^+$  se van liberando lentamente, tienen efectos bacteriostáticos y encuentran su principal aplicación en oftalmología. Cremas de nitrato de plata y sulfodiazina de plata son usadas

para el tratamiento de quemaduras y han reducido notablemente la mortalidad derivada de las grandes quemaduras.

Consideraciones sobre la salud y ambientales han reducido drásticamente el uso de compuestos antimicrobianos metálicos en medicina, odontología, el comercio y la agricultura.

### Colorantes como agentes antimicrobianos

Los colorantes son importantes en las técnicas de tinción y como agentes selectivos y diferenciales en los medios de cultivos. Debido a que los colorantes básicos de anilina tales como cristal violeta, fucsina básica y verde de malaquita son muy activos a bajas concentraciones (0,2-2 ppm) frente a especies de bacterias Gram-positivas y hongos diversos, se utilizan en soluciones y ungüentos para tratar infecciones de la piel. El efecto antibacteriano se debe a la pseudobase, que es más lipofílica que el respectivo catión, y bajo esa forma accede al interior celular, donde se une a los grupos fosfato de los ácidos nucleicos. Su principal inconveniente es que muchos de ellos se inactivan en presencia de suero y otras proteínas. Los colorantes de acridina amarillas como acriflavina, proflavina y tripoflavina interfieren en la biosíntesis de ácidos nucleicos (intercalándose entre las bases) y proteínas. Se utilizan para la antisepsia en el tratamiento de heridas en clínicas médicas y veterinarias y no se inactivan en presencia de suero. Los colorantes seguirán teniendo aplicaciones limitadas debido a que manchan y tienen un estrecho espectro de actividad.

### Ácidos y álcalis

Condiciones de muy bajo o alto pH pueden destruir o inhibir a las células microbianas, pero están limitados en las aplicaciones debido a su naturaleza corrosiva, cáustica y peligrosa. Las soluciones acuosas de hidróxido de amonio siguen siendo un componente común de detergentes, limpiadores y desodorantes. Los ácidos orgánicos son ampliamente utilizados en la conservación de alimentos, ya que impiden la germinación de esporas y el crecimiento de bacterias y hongos y debido a que son generalmente considerados como seguros para comer. Ciertos ácidos orgánicos como el acético, láctico y propiónico aparecen en alimentos fermentados, actuando como conservantes naturales.

El ácido acético en forma de vinagre es un agente que inhibe el crecimiento bacteriano; el ácido propiónico se incorpora habitualmente en panes y pasteles; el ácido láctico se añade a aceitunas para prevenir el crecimiento de bacterias anaerobias (especialmente *Clostridium*); y los ácidos benzóico y sórbico se añaden a las bebidas, jarabes y margarina para inhibir el crecimiento de levaduras.

### **Controles del proceso de esterilización**

Son controles que se realizan sobre el método de esterilización. Monitorean o controlan si el proceso de esterilización funciona correctamente. Se pueden utilizar **indicadores biológicos** como controles del proceso de esterilización. Estos indicadores son preparaciones estandarizadas de microorganismos relativamente resistentes (generalmente esporas de *Bacillus*) al método de esterilización que se emplea. Los indicadores se procesan en forma conjunta con el material a esterilizar. Una vez concluido el proceso de esterilización las esporas son inoculadas en medios de cultivo adecuados e incubados durante un determinado período de tiempo. Si el proceso de esterilización fue correctamente empleado y funciona bien no debe observarse desarrollo o crecimiento del indicador biológico incubado.

Por otro lado, se pueden utilizar **indicadores fisicoquímicos** de los que existen dos tipos:

- **Termocuplas**: son métodos directos que registran la temperatura a la que se desarrolla la esterilización.
- **Sustancias de punto de fusión conocido**: se utilizan generalmente para autoclaves y son sustancias con un punto de fusión similar al de la temperatura de esterilización del proceso. Estas sustancias están mezcladas con un colorante y al fundir indican si se alcanzó la temperatura y se mantuvo el tiempo óptimo de esterilización.

## **Agentes químicos de uso terapéutico**

Los quimioterápicos son sustancias químicas de origen natural o sintético 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. Los agentes quimioterápicos se clasifican con respecto a su naturaleza química, su efectos, blanco o mecanismo de acción, o su origen pudiendo ser naturales u obtenidos por síntesis química.

Originalmente el término antibiótico se refería únicamente a sustancias naturales producidas por microorganismos del suelo, pero en la actualidad incluye a los productos de origen natural, sintéticos y a las formas químicamente modificadas de los naturales (semisintéticos) como la ampicilina, la primera penicilina semisintética. Los principales productores naturales de antibióticos provienen de bacterias aerobias del suelo y de hongos. Al inhibir el crecimiento de otros microorganismos en el mismo hábitat (antagonismo), los productores de antibióticos presumiblemente eliminan a sus competidores por los nutrientes y el espacio.

Las mayores cantidades de antibióticos se derivan de bacterias de los géneros *Streptomyces* y *Bacillus* y hongos en los géneros *Penicillium* y *Cephalosporium*. Las bacterias del género *Streptomyces* son la fuente de dos tercios de los antibióticos de uso medicinal.

## **Efecto de los antibióticos**

Estos agentes pueden afectar a las bacterias de dos maneras: (1) inhibiendo su crecimiento (efecto bacteriostático) o (2) matándolas (efecto bactericida). Para diferenciar entre ambos efectos podemos añadir dicho compuesto (en concentraciones inhibitorias) a un cultivo en fase exponencial de crecimiento y determinar a diferentes tiempos el crecimiento mediante métodos turbidimétricos y la viabilidad mediante una enumeración de gérmenes viables (ver Cap. VII. Recuento de viables). Para la determinación de viabilidad debemos eliminar la sustancia del medio de cultivo o inactivarla.

Si graficamos el efecto de diferentes agentes sobre el crecimiento y la viabilidad de los microorganismos podemos obtener diferentes patrones:

- Bacteriostático son aquellos que inhiben el crecimiento (turbiedad constante luego de añadir la droga), pero no mata a las bacterias (número constante de células viables).
- Bactericida son aquellos que inhiben el crecimiento (turbiedad constante luego de añadir la droga) y mata a las bacterias (disminución del número de viables)
- Bacteriolítico son aquellos que causan la muerte de las bacterias y su lisis, por lo tanto, hay disminución de la turbiedad y del número de viables.

## **Mecanismo de acción de los antibióticos**

Los principales blancos sobre los que actúan y macromoléculas con las que interfieren:

- 1) Biosíntesis de la pared celular, 2) Síntesis de proteínas, 3) Síntesis de ácidos nucleicos, 4) Metabolismo bacteriano, y 5) Membrana celular.

El fundamento de los quimioterápicos es la toxicidad selectiva, o sea que deben matar o inhibir el crecimiento de microbios sin dañar al mismo tiempo los tejidos del hospedador. Este concepto de la toxicidad selectiva es central a la quimioterapia. Los mejores fármacos son los que actúan específicamente en estructuras o enzimas microbianas no presentes en las células de vertebrados. Ejemplos de fármacos con excelente toxicidad selectiva son los que bloquean la síntesis de la pared celular en bacterias (penicilinas). Ellos tienen baja toxicidad y pocos efectos directos sobre las células humanas ya que las células humanas carecen de una pared celular y por tanto no son afectadas por esta acción del antibiótico.

Entre los más tóxicos para las células humanas son fármacos que actúan sobre una estructura común tanto para el agente infeccioso y la célula del hospedador, tal como la membrana celular (por ejemplo, anfotericina B utilizada para tratar las infecciones por hongos).

### 1) Antibióticos que inhiben la síntesis de pared celular

Las paredes celulares de la mayoría de las bacterias contienen una capa rígida de peptidoglicano, que protege la célula contra la rotura en los ambientes hipotónicos. Las bacterias activas deben sintetizar constantemente nuevo peptidoglicano y transportarlo a su lugar apropiado en la envoltura celular. Las drogas tales como penicilinas y cefalosporinas reaccionan con una o más de las enzimas requeridas para completar este proceso, desarrollando en la célula puntos débiles durante el crecimiento de la pared y pudiendo llegar a ser frágiles osmóticamente. Los antibióticos que producen este efecto se consideran bactericidas o bacteriolíticos, porque el microorganismo al estar debilitado puede ser sujeto de lisis en un ambiente hipotónico. Es fundamental tener en cuenta que la mayoría de estos antibióticos son activos sólo en células jóvenes en crecimiento, porque las células viejas, inactivas o latentes no sintetizan peptidoglicano.

Las penicilinas y cefalosporinas se unen a las transpeptidasas y bloquean el entrecruzamiento reticular de las moléculas de peptidoglicano, interrumpiendo así el último paso de síntesis de la pared celular. Esto origina una acumulación de precursores del peptidoglicano sin ensamblar y la activación de una serie de autolisinas (amidadasas, glucosidasas) que hidrolizan el peptidoglicano maduro de la bacteria, lo que provoca la lisis celular si la bacteria se encuentra en un medio hipotónico.

Las penicilinas que no penetran la membrana externa son menos eficaces contra las bacterias Gram-negativas. Penicilinas de amplio espectro (ampicilina y carbenicilina) y cefalosporinas (ceftriaxona) pueden pasar a través de las paredes celulares de las especies Gram-negativas. La cicloserina inhibe la formación de las subunidades básicas de peptidoglicano, y la vancomicina impide la elongación del peptidoglicano.

### 2) Antibióticos que bloquean la síntesis de proteínas

La mayoría de los fármacos que inhiben la síntesis de proteínas reaccionan con el complejo ribosoma-mRNA. Aunque las células humanas también tienen ribosomas, los ribosomas de eucariotas son diferentes en tamaño y estructura de los procariontes, por lo que estos antimicrobianos por lo general tienen una acción selectiva contra las bacterias.

Dos posibles blancos de la inhibición ribosomal son la subunidad 30S y la subunidad 50S. Los aminoglucósidos (estreptomina, kanamicina) interaccionan con la subunidad 30S y provocan una lectura errónea del ARNm, lo que lleva a la producción de proteínas anormales.

Las tetraciclinas bloquean la unión del ARNt en el sitio A aceptor y efectivamente detienen la síntesis de proteínas. Otros antibióticos se unen a sitios en la subunidad 50S de una manera que impide la formación de enlaces peptídicos (cloranfenicol) o inhibe la translocación de la subunidad durante la traducción (eritromicina). Las oxazolidinonas son una nueva clase de drogas que afectan el montaje del ribosoma completo mediante el bloqueo del sitio de unión para las subunidades 50S y 30S.

### 3) Antibióticos que afectan la síntesis de ácidos nucleicos

Algunos antimicrobianos interfieren con la síntesis de ácido nucleico mediante el bloqueo de la síntesis de los nucleótidos, la inhibición de la replicación, o frenando la transcripción. Debido a que el funcionamiento del ADN y el ARN son necesarios para la traducción apropiada, los efectos sobre el metabolismo de las proteínas pueden ser de largo alcance.

Varios agentes antimicrobianos inhiben la síntesis de ADN. Las quinolonas de amplio espectro inhiben las enzimas que controlan el súper-enrollamiento del ADN o helicasas, deteniendo de este modo la replicación y el crecimiento bacteriano.

### 4) Antibióticos que afectan a vías metabólicas

Las sulfonamidas y trimetoprima interfieren con el metabolismo del folato mediante el bloqueo de las enzimas requeridas para la síntesis de tetrahidrofolato, que es necesario para la síntesis del ácido fólico y la eventual producción de ADN y ARN y aminoácidos. La trimetoprima y sulfonamidas

se dan a menudo simultáneamente para lograr un efecto sinérgico. Las sulfonamidas son fármacos que actúan imitando el ácido para-aminobenzoico normal de una enzima que sintetiza el precursor de ácido fólico en un proceso llamado inhibición competitiva.

La toxicidad selectiva de estos compuestos se explica por el hecho de que los mamíferos utilizan ácido fólico de su dieta y por lo tanto no poseen este sistema enzimático. Esto hace que sea posible inhibir parásitos protozoarios y bacterianas, que deben sintetizar el ácido fólico, mientras que deja al hospedador humano no afectado.

### 5) Antibióticos que alteran la función de la membrana celular

Una célula con una membrana dañada invariablemente muere por interrupción de su metabolismo o lisis. Ni siquiera tiene que estar dividiéndose activamente para ser afectada. Las clases de antibióticos que dañan las membranas celulares por lo general tienen especificidad para determinados grupos microbianos, en base a diferencias en los tipos de lípidos en sus membranas celulares.

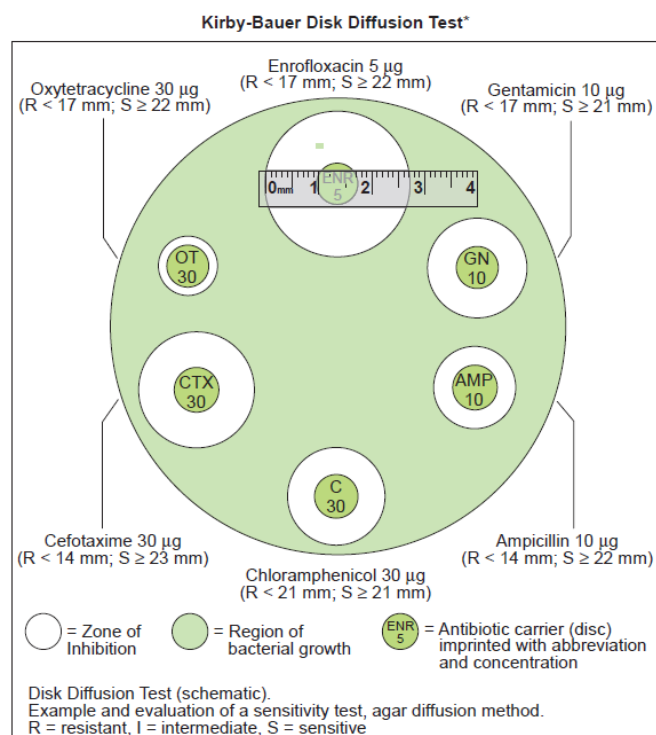
Las polimixinas interactúan con los fosfolípidos de membrana y causan una fuga de proteínas y bases nitrogenadas, sobre todo en las bacterias Gram-negativas. Los antibióticos poliénicos antifúngicos (anfotericina B y nistatina) forman complejos con los esteroides de las membranas fúngicas, lo que provoca aberturas anormales y la filtración de iones pequeños. Desafortunadamente, esta selectividad no es exacta, y las similitudes en las membranas de las células microbianas y animales significan que la mayoría de estos antibióticos puede ser bastante tóxico para las células de seres humanos.

### Mecanismo de resistencia adquirida a los antibióticos

Un resultado desafortunado de la utilización de los antimicrobianos es el desarrollo de resistencia microbiana a los antibióticos, una respuesta de adaptación en el que los microorganismos comienzan a tolerar una cantidad de fármaco que normalmente sería inhibitorio. El desarrollo de mecanismos para resistir a los antimicrobianos es el resultado de la versatilidad y adaptabilidad genética de las poblaciones microbianas. La resistencia puede desarrollarse por mutación de los genes residentes o por adquisición de nuevos genes, resultando en: (1) modificación del compuesto, (2) modificación o reemplazo del blanco antibacteriano, (3) disminución de la permeabilidad y/o activación de la eliminación del compuesto del interior de la célula.

### Antibiograma

La selección de un agente antimicrobiano apropiado consiste en el ensayo de la actividad *in vitro* de varios antibióticos contra el agente infeccioso por medio de métodos estandarizados. En general, estas pruebas implican la exposición de un cultivo puro de la bacteria a varios medicamentos diferentes y la observación de los efectos de los fármacos sobre el crecimiento.



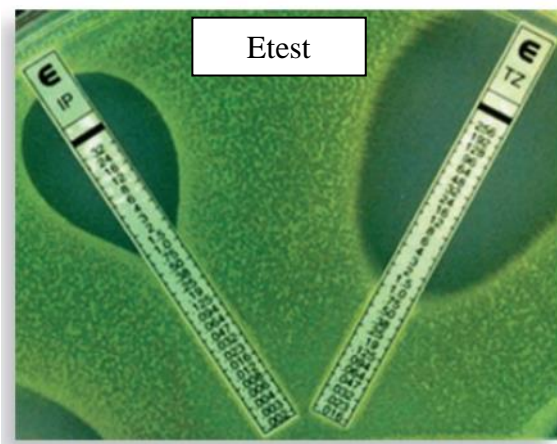
Test de difusión Kirby-Bauer. Si la bacteria es sensible a una droga, se desarrolla una zona de inhibición alrededor del disco. A mayor tamaño de esta zona, mayor es la sensibilidad de la bacteria hacia la droga. El diámetro del halo de inhibición se mide en milímetros y se evalúa como susceptible o resistente en función de estándares (R, I o S).

La técnica de Kirby-Bauer es una prueba de difusión en agar que proporciona datos útiles sobre la susceptibilidad antimicrobiana. En esta prueba, la superficie de una placa de medio de cultivo sólido se propaga con la bacteria de prueba, y pequeños discos que contienen una cantidad previamente medida de antimicrobianos se dispensa sobre el césped bacteriano. Después de la incubación, se mide la zona de inhibición que rodea a los discos y se compara con un estándar para cada fármaco. El perfil de la sensibilidad a los antimicrobianos, o antibiograma, proporciona datos para la selección del antibiótico adecuado.

### Concentración inhibitoria mínima

Un ensayo alternativo cuantitativo que proporciona una calificación cuantitativa de la eficacia del fármaco es la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Una forma de determinación es utilizar el test "Etest". Esta prueba utiliza una tira de plástico que contiene un gradiente previamente medido de un antibiótico, marcado con una escala que indica el aumento de concentraciones del fármaco en  $\mu\text{g}$ .

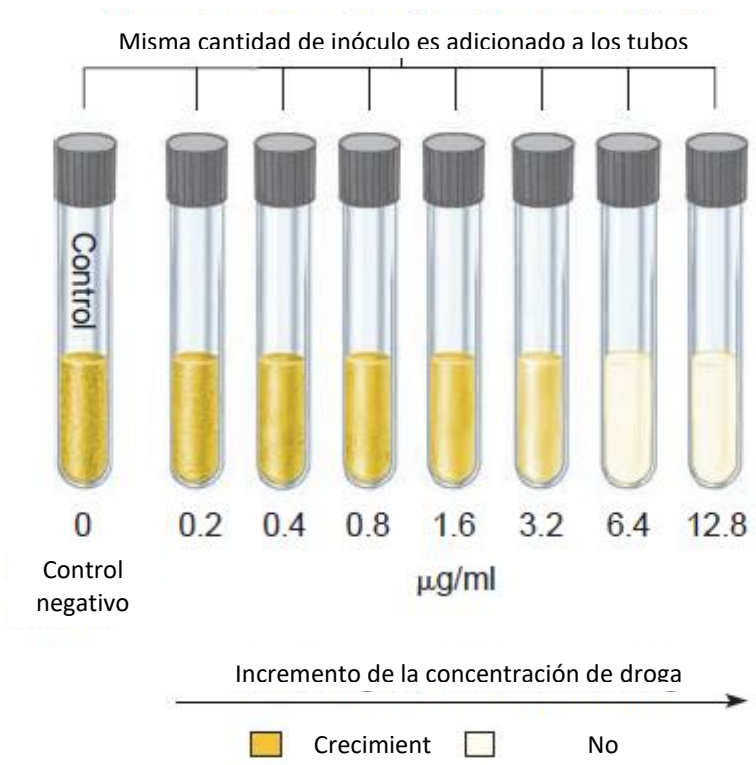


Cuando las tiras se colocan en una placa con la bacteria en estudio y se incuban, un área ovalada llamada la elipse de inhibición se desarrolla adyacente a la tira. El punto más bajo de la escala (concentraciones más bajas son hacia el centro de la placa), donde la elipse se empieza a formar corresponde con la CIM. Además de proporcionar una clasificación numérica precisa de la CIM, este método permite realizar pruebas para una amplia variedad de fármacos y tipos de microbios, incluyendo anaerobios, micobacterias y hongos.

### **Test de dilución en caldo para determinar la CIM.**

Resultados más sensibles y cuantitativos de CIM también se pueden obtener con las pruebas de dilución en tubo. Primero, el antimicrobiano se diluye en serie al medio en tubos de caldo, y luego cada tubo se inocula con una pequeña muestra uniforme de cultivo puro, se incuban, y se examina en cada uno el crecimiento bacteriano (turbidez). La menor concentración (dilución más alta) de fármaco que inhibe el crecimiento visible es la CIM.

La CIM es útil para determinar la dosis eficaz más pequeña de un fármaco y en la provisión de un índice comparativo contra otros antimicrobianos.



## Capítulo I.B

### Medio de cultivos, siembra y aislamiento

En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos no se encuentran aislados, sino integrados en poblaciones mixtas. Para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus propiedades, es necesario separar unos de otros y trabajar con especies aisladas, obteniendo cultivos axénicos o puros. Un cultivo axénico o puro es aquel que contiene un sólo tipo de microorganismo y que procede generalmente de una sola célula; el crecimiento de ésta origina, en medio sólido, una masa de células fácilmente visible que recibe el nombre de colonia.

Para obtener **cultivos axénicos o puros** a partir de una población microbiana mixta, se utilizan las denominadas técnicas de aislamiento, que fueron desarrolladas durante el siglo XIX. Robert Koch introdujo los medios sólidos, complementados con agar, y las placas de Petri en Bacteriología, permitiendo así la separación física de las colonias sobre la superficie del medio de cultivo o en el interior del mismo. Para que un microorganismo pueda ser cultivado en una condición determinada tiene que estar provisto de todos los nutrientes necesarios en un medio de cultivo artificial como se discutirá en el próximo capítulo. Este hito permitió al examen minucioso de un microbio, su morfología y fisiología.

Para lograr que estos cultivos no se contaminen con otros microorganismos del ambiente son necesarias las técnicas de esterilización y prácticas asépticas. Esto significa que para inocular se necesita utilizar un medio de cultivo estéril y puntas o ansas de inoculación estériles. Además, se deben adoptar medidas para evitar la introducción de materiales no estériles, como partículas de polvo del aire directamente en los medios de cultivos.

#### Medios de Cultivo

La mayoría de los medios de cultivo discutidos aquí están diseñados para bacterias y hongos, aunque algas y algunos protozoos pueden ser propagadas en los medios similares. Sólo se pueden cultivar virus en cultivos de células del huésped.

Los medios de cultivo se pueden clasificar en tres categorías generales basados en sus propiedades: estado físico, composición química y el fundamento.

Estado físico	Composición química	Propósito
Líquidos Semisólidos Sólidos que pueden convertirse en líquidos Sólidos	Sintéticos o definidos No sintéticos o complejos	Propósito general Enriquecimiento Selectivos Diferenciales Crecimiento anaeróbico Ensayo metabólico

#### Clasificación por el estado físico de los medios



Medio de cultivo líquido en tubo cerrado

Los medios de cultivo líquidos se definen como soluciones a base de agua que no se solidifican a temperaturas ambiente. Estos medios o caldos están hechos mediante la disolución de varios nutrientes en agua destilada. El crecimiento se produce en todo el recipiente y puede entonces presentar una apariencia dispersa, turbia, o grumosa. Un medio común de laboratorio, el caldo nutritivo, contiene extracto de carne y peptona disueltos en agua. Otros ejemplos de medios líquidos

Los medios de cultivo semisólidos a temperatura ambiente tienen una consistencia viscosa, ya que contienen una cantidad de agente solidificante (agar o gelatina) que los espesa, pero no produce un sustrato firme. Este tipo de medios de cultivo se utilizan para determinar la motilidad de las bacterias (tubo 3 de la Fig.) y para localizar una reacción en un sitio específico. Por ejemplo, el medio SIM permite realizar ensayos de la motilidad ya que contiene 0,3 a 0,5% agar y probar las características fisiológicas utilizadas en identificación (producción de sulfuro de hidrógeno y la reacción del indol) (tubo 4 de la Fig.).



Ejemplos de medios semisólidos conteniendo baja cc de agar.

(2) or motility (3). The medium reacts with any  $H_2S$  gas to produce a black precipitate (4).

Los medios sólidos proporcionan una superficie firme en la cual las células pueden formar colonias discretas y son ventajosos para el aislamiento de bacterias y hongos. Vienen en dos formas: licuables y no-licuables. Medios sólidos licuables, a veces llamado medio sólido reversible, contienen un agente solidificante que cambia sus propiedades físicas en respuesta a la temperatura. El más utilizado y efectivo de estos agentes es el agar (al 1,5%) que es un polisacárido aislado del alga roja *Gelidium*. Los beneficios de agar son numerosos. Es sólido a temperatura ambiente, y se derrite (licúa) a la temperatura de ebullición del agua (100 °C). Una vez licuado, el agar no se resolidifica hasta que se enfría a 42 °C, por lo que puede ser inoculado o manipulado a temperaturas (45 °C a 50 °C) que no dañe los microbios. Agar es flexible y moldeable, y proporciona un marco básico para mantener la humedad y los nutrientes. Otra propiedad útil es que no es fácilmente digerible y por lo tanto no es utilizado como nutriente por la mayoría de los microorganismos excepto algunas bacterias del suelo del género *Streptomyces* que contienen enzimas que lo pueden degradar.



(10)



Preparación de medios sólidos en placas y tubos en forma de picos de flauta

Aunque la gelatina es no tan satisfactoria como el agar, creará una superficie razonablemente sólida en concentraciones de 10 % a 15 %. El principal inconveniente para la gelatina es que puede ser digerida por los microbios y se derrite a temperaturas más bajas que el agar, dejando un residuo líquido.

## Siembra

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Para sembrar en microbiología es necesario mantener la habitación sin corrientes de aire, estar al lado de la llama de un mechero (no más de 15 cm. de distancia). También se puede trabajar bajo campana, o en flujo laminar, previa esterilización con luz U.V.

Luego de sembrado, el medio de cultivo se incubaba a una temperatura adecuada para el crecimiento. La siembra puede realizarse en medio líquido, sólido o semisólido, utilizando punta, ansa, hisopo o pipeta estéril.

### Siembra en medios sólidos

#### a) Tubos con agar inclinado.

Para sembrarlos, se mueve el ansa o la punta suavemente sobre la superficie del agar con un movimiento en zigzag desde el fondo hasta la parte superior, cuidando de no dañar el agar. Se observará el aspecto general del medio y la aparición de crecimiento sobre su superficie. Este tipo de siembra permite el cultivo de microorganismos aerobios o anaerobios facultativos y además se utiliza para almacenar cultivos frescos durante cortos períodos de tiempo a temperaturas de 4 °C.

#### b) Siembra en placas de Petri.

Puede ser sobre la superficie utilizando espátula de Drigalsky, ansa o hisopo o mezclando el inóculo con el medio de cultivo agarizado aún fundido, a temperatura de unos 45-50 °C, y vertiéndolo en la placa de Petri.

Las placas se incuban invertidas (con el medio en la tapa de arriba y las colonias “colgando del techo”), ya que la alta concentración de agua en el medio puede provocar condensación durante la incubación y si cae sobre la superficie del agar y se extiende dando un crecimiento confluyente. En medio sólido cada célula viable dará origen a una colonia y por lo tanto la siembra en placas se puede utilizar, no solo para cultivar microorganismos, sino además para contar y aislar.

El aislamiento se puede lograr directamente a partir de una muestra cuando los microorganismos están en una proporción adecuada. Cuando el microorganismo que se desea aislar e identificar se encuentra en baja proporción en la muestra, o interesa un solo tipo de microorganismo, se lleva a cabo un procedimiento que involucra una primera etapa de aumento del número de microorganismos del tipo que se desea aislar en relación al resto de la población. Luego se aísla por el método de estrías o por dilución y se identifica.

### **Aislamiento en medio sólido**

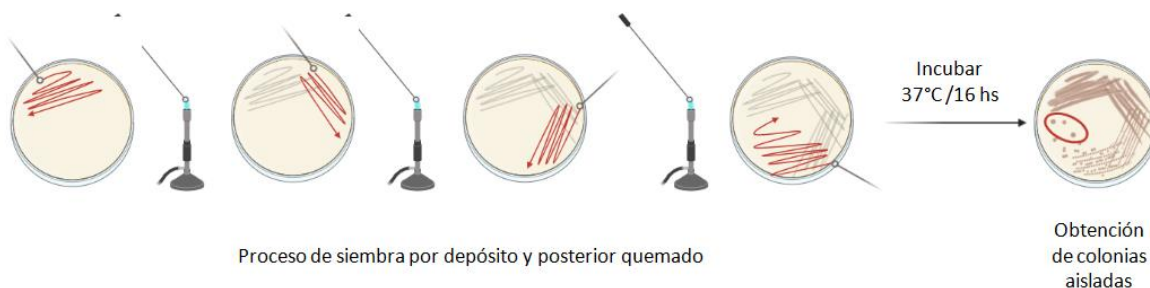
#### a) Por diseminación en superficie de un medio sólido en placa de Petri

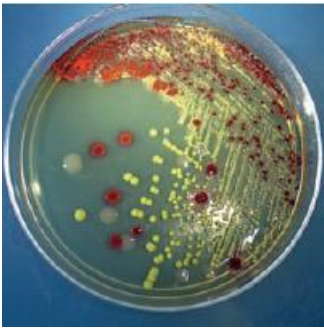
Es la técnica más utilizada. Con un ansa de siembra, calentada al rojo vivo en el mechero y enfriada cerca del mismo, se toma una muestra del cultivo de microorganismos y se extiende sobre la superficie de la placa con el medio agarizado, pero sin hacer presión para no dañar el agar. Se lleva la placa a incubar a la temperatura adecuada, siempre en posición invertida lo que evitará que el agua de condensación se deposite sobre la superficie del medio, dificultando la obtención de colonias aisladas. Mediante estas técnicas se obtienen colonias aisladas a partir de una muestra que contenga un elevado número de bacterias.

Existen distintos tipos de trazados tendientes a lograr una buena separación entre los gérmenes sembrados. Se puede sembrar por:

1. Agotamiento de ansa: Se flamea el ansa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se realizan estrías en dos placas en forma consecutiva sin recargar el ansa.

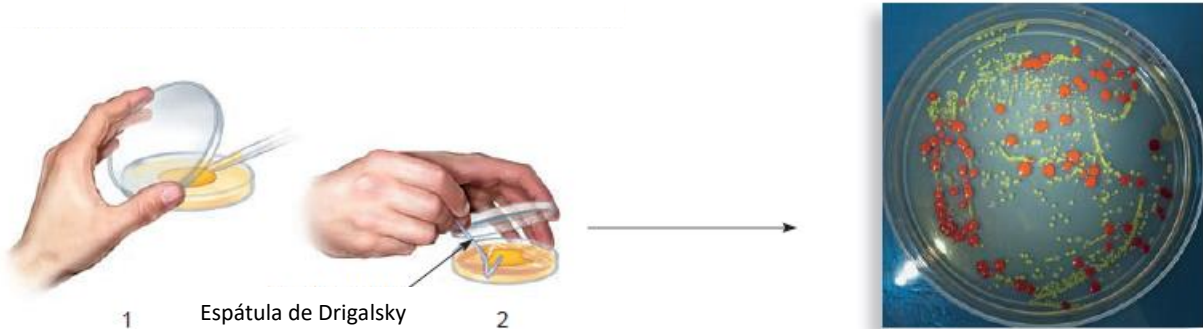
2. Depósito y posterior quemado: Se carga el ansa con la muestra y se deposita por estrías sobre un área pequeña de la superficie de la placa. Se retira el ansa, se quema a la llama, y luego de enfriarla en el interior de la placa. Luego se practican nuevas estrías por otra zona tocando ligeramente la muestra sembrada anteriormente. Este proceso se repite sucesivamente hasta cubrir toda la superficie de la placa con las estrías.





3. Dilución previa en solución fisiológica o caldo: Se toma la muestra para aislar y se la resuspende en solución fisiológica o caldo nutritivo, preparando luego diluciones decimales en condiciones asépticas. Se toman las diluciones y se estra con ellas una placa para cada una. En la dilución adecuada se obtendrán colonias aisladas.

4. Extensión en superficie con espátula de Drigalsky: Aquí también pueden prepararse diluciones decimales en condiciones asépticas. Se deposita sobre la superficie de la placa una gota o 0,1 ml de una determinada dilución del cultivo y se extiende con ayuda de la espátula de Drigalsky, previamente esterilizada por flameado, en todas las direcciones. Tras el período de incubación las colonias aisladas aparecen sobre la superficie, distribuidas uniformemente si la siembra se ha realizado de forma correcta. Podrán diferenciarse las colonias de acuerdo a su tamaño, forma, color, textura, etc. Esta técnica de siembra, además de permitir el aislamiento de colonias, permite el recuento de bacterias viables en la muestra, si conocemos exactamente el volumen de muestra sembrado.



**b) Por mezcla**

Esta técnica tiene la ventaja de permitir el cálculo del número de bacterias presentes en la muestra, si se trabaja con exactitud. Se mezcla en tubos un volumen conocido de distintas diluciones de la muestra con el medio de cultivo fundido y atemperado aproximadamente a 45 °C. El contenido se homogeneiza por rotación del tubo entre las manos, y luego se lo vierte en una placa de Petri. Tras la homogeneización, se dejan enfriar las placas hasta que se solidifique el medio y posteriormente se incuban a la temperatura adecuada (siempre en posición invertida).

Las colonias aparecen distribuidas por toda la masa del agar. Aquellas que están en la superficie tendrán distintas características, dependiendo del tipo microbiano, mientras que las colonias que se desarrollan en el interior, bajo la superficie del agar, tienen forma lenticular, aunque los microorganismos que formen las distintas colonias sean de distinto tipo. Por tanto, las colonias que aparecen en la profundidad del agar son siempre biconvexas y no se diferencian unas de otras por su morfología. Aunque con esta técnica se obtienen colonias aisladas, generalmente sólo se utiliza para determinar el número de microorganismos viables en una muestra, cuando éstos son anaerobios facultativos o microaerófilos.



**Métodos especiales**

Se basan en las características del microorganismo que se quiere aislar y la utilización de un medio

selectivo o condición selectiva. Hay que tener en cuenta que puede haber microorganismos que poseen idénticos comportamientos frente a un mismo agente físico o químico.

a) Calentamiento: Se utiliza para el aislamiento de microorganismos esporulados de los no esporulados. Consiste en calentar la suspensión a 80-100 °C durante 10 min. y 80 °C durante 15 o 30 min. Luego se siembra en medios sólidos.

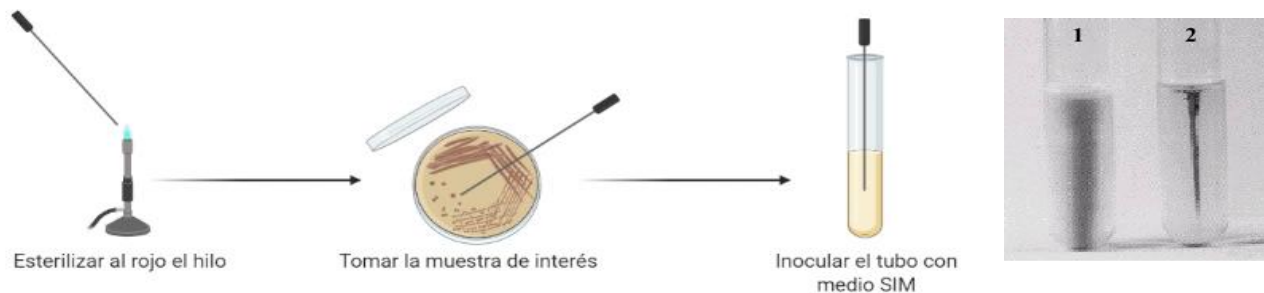
b) Agregado de álcali o ácido: Tratamiento de la muestra con algunos de estos agentes ya que existen microorganismos que los resisten y otros que no.

c) Variaciones de la temperatura de incubación: incubando a dos temperaturas distintas.

d) Presencia de sales, colorantes o inhibidores selectivos: Debido a la capacidad de distintos microorganismos de crecer o no en medios con sales, sustratos, colorantes o antibióticos, se utilizan distintos medios de cultivo con el fin de lograr su aislamiento.

### Siembra en medios semisólidos

Se utilizan tubos sin inclinar. Este tipo de medio contiene una proporción menor de agar que los medios sólidos, y la siembra se lleva a cabo con un ansa en hilo previamente esterilizado con el mechero. El medio queda inoculado al introducir el hilo en profundidad hasta el fondo del tubo, retirándolo posteriormente por la misma trayectoria utilizada al realizar la picadura.

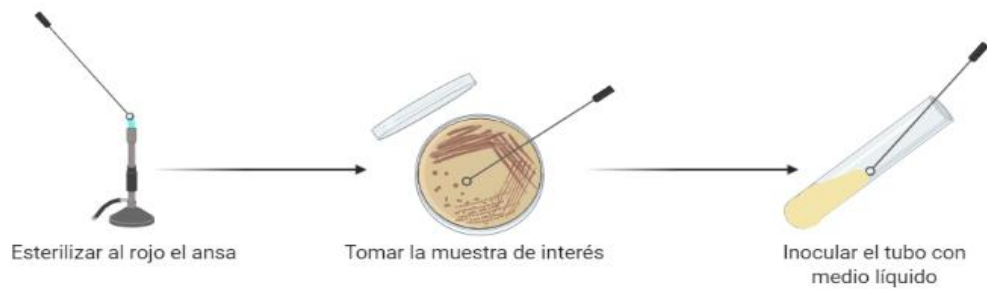


En medio semisólido se podrá comprobar si el microorganismo es o no móvil, ya que en el primer caso se observará que el crecimiento difunde alrededor de la zona donde se hizo la picadura, detectándose turbidez. Los microorganismos inmóviles crecerán únicamente a lo largo de la picadura. Una siembra con asa o con un cierto movimiento de vaivén podría originar un patrón de crecimiento que se interpretaría erróneamente como movilidad bacteriana. Este tipo de siembra en picadura sirve, también, como otro de método de conservación de microorganismos anaerobios facultativos.

### Siembra en medio líquido

Habitualmente se realiza en tubos, frascos o Erlenmeyer. En estos casos, las bocas de los tubos, Erlenmeyer y frascos deben pasarse por la llama (flameado), destaparlos, sembrar con ansa flameada y enfriada, y luego volverlos a tapar, siempre cerca del mechero. El flameado genera corrientes de convección que previenen que los contaminantes del aire caigan dentro de los recipientes. El calentamiento puede también matar los microorganismos que se encuentren en la boca de los recipientes.

En los cultivos líquidos no tiene lugar la formación de colonias, por lo tanto, no sirven como técnica de aislamiento. La utilización de medios de cultivo líquidos permite la obtención de una población microbiana grande, con un elevado número de microorganismos, para ser utilizados posteriormente. En estos cultivos se examinará la existencia de enturbiamiento más o menos intenso, la formación de una película o velo sobre la superficie, la aparición de sedimento en el fondo del tubo, etc.



## Clasificación de los medios de cultivo por su composición

### Medios sintéticos o definidos

Los medios de cultivo con una composición química definida se denominan medios sintéticos o definidos. Tales medios contienen nutrientes químicos puros que varían poco de una fuente a otra y que tienen un contenido molecular especificado por medio de una fórmula exacta. Estos medios se preparan 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. Algunos medios de cultivo sintéticos, tales como medios mínimos para los hongos o bacterias, no contienen nada más que unas pocas sales y aminoácidos disueltos en agua. Otros contienen decenas de ingredientes medidos con precisión. Tales medios de cultivos sintéticos y mínimos son muy útiles en la investigación de fuentes nutricionales específicas y sólo pueden ser utilizados cuando se conocen las necesidades nutricionales exactas de los organismos de ensayo. Un ejemplo es el medio definido que fue desarrollado para hacer crecer el protozoo parásito *Leishmania* requiere 75 sustancias químicas diferentes.

El conocimiento de la nutrición microbiana permite el cultivo de los microorganismos en el laboratorio. En general, todos los microorganismos tienen parecidos requerimientos de macro- y micronutrientes, aunque 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.

### Medios complejos o indefinidos

Por otro lado, tenemos los medios de cultivo complejos o indefinidos cuya composición química exacta se desconoce, ya que se preparan utilizando infusiones y extractos de materiales naturales complejos. Algunos de los componentes típicos de estos medios complejos son:

- Extracto de carne: se prepara mediante la extracción de los productos solubles de la carne hervida o macerada y luego concentrado hasta la consistencia de una pasta o polvo. Su composición es compleja, contiene proteínas, muy pocos aminoácidos libres, bases nitrogenadas y glúcidos.
- Extractos de levadura: se prepara a partir del extracto soluble resultante de levaduras lisadas. Se lo seca y concentra a consistencia de polvo. Contiene gran cantidad de vitaminas.
- Peptonas: se denominan peptonas a productos sin identidad química definida, obtenidos a partir de la hidrólisis química o enzimática parcial de proteínas. Sometiendo las proteínas a hidrólisis se llega a las peptonas, polipéptidos y finalmente a los aminoácidos. Entre estos distintos compuestos no existe una línea neta de demarcación pasándose de unos a otros en forma gradual con la extensión del proceso hidrolítico. No todos los productos de hidrólisis son iguales ni utilizados de la misma forma por las bacterias. Para algunas bacterias la fuente de obtención de nitrógeno pueden ser proteínas parcialmente hidrolizadas, pero para otras el crecimiento depende o al menos es favorecido por la presencia de aminoácidos libres. Las peptonas utilizadas más comunes son preparadas a partir de proteína de carne o de la caseína de la leche.

- Casaminoácidos. Se produce mediante la hidrólisis ácida completa de la caseína que genera una mezcla de los aminoácidos. Cabe destacar que el tratamiento ácido conlleva la eliminación del triptofano.

La utilización de estos componentes genera 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 orgánicas, 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.

### **Clasificación de los medios de cultivo con un propósito o fin experimental**

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:

Medios selectivos son aquellos que permiten seleccionar un tipo (o unos pocos tipos) de microorganismos. En el laboratorio se emplean muchos medios selectivos sólidos que incorporan ciertas sustancias que inhiben el crecimiento de ciertas bacterias, pero permiten el crecimiento de otras.

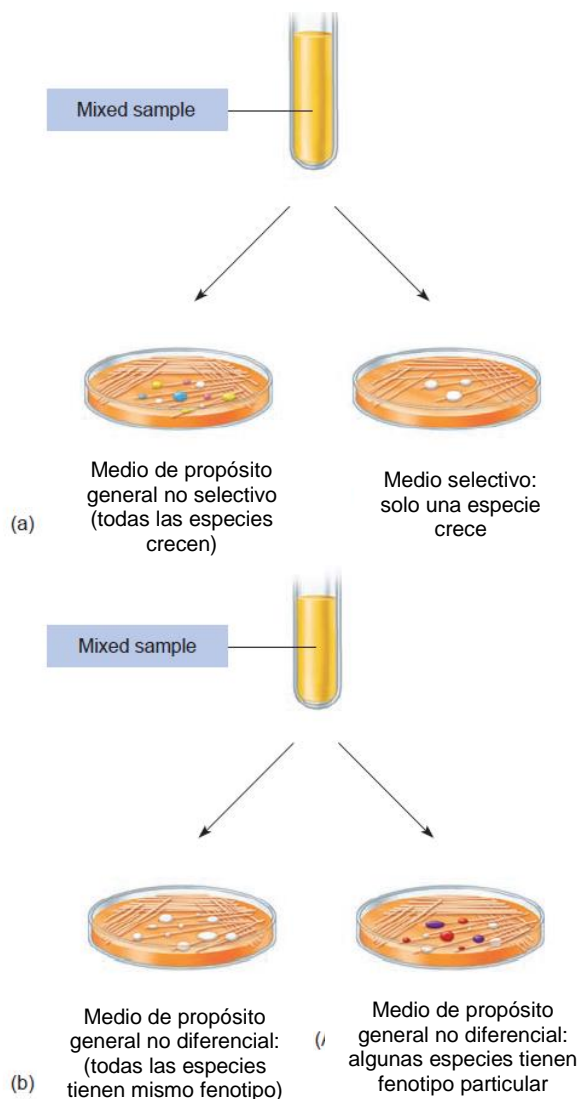
- El Mac Conkey contiene cristal violeta que inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas.

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.

-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 pueden ser simultáneamente selectivos y diferenciales.



- El agar de Mac Conkey es 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 contra selección de muchas Gram-negativas debido a las sales biliares (que son agentes tensoactivos 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 Mac Conkey 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  $\text{NH}_4^+$ , que alcalinizan el medio de cultivo, lo cual se traduce en que el indicador rojo neutro vira a amarillo.

Ejemplos de medios selectivos		
Medio	Agente selectivo	Aislamiento de
Manitol salado	7,5 % NaCl	<i>Staphylococcus aureus</i>
Mac Conkey	Sales biliares y cristal violeta	Enterobacterias Gram negativas
Agar Cetrimida	Cetrimida	<i>Pseudomonas</i>
Medio conteniendo un Ab	Ab	Bacterias resistentes a Ab

Ejemplo de medios diferenciales		
Medio	Agente que facilita diferenciación	Para diferenciar
Manitol salado	Manitol y rojo fenol	<i>Staphylococcus aureus</i>
Mac Conkey	Lactosa y rojo neutro	Enterobacterias que fermentan la lactosa y bajan el pH
Agar sangre	Glóbulos rojos intactos	Distinto tipo de hemólisis
SIM	Tiosulfato y hierro	Productores de $\text{H}_2\text{S}$ , movilidad y producción de indol

## MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS



Dentro de los medios que habitualmente se emplean en la siembra de muestras son:

**Agar Sabouraud Dextrosa:** es un medio de cultivo empleado para el aislamiento de hongos patógenos y no patógenos. Es un agar peptona suplementado con dextrosa, las peptonas proporcionan compuestos nitrogenados y la dextrosa proporciona la fuente de energía.

**Agar YPD:** se emplea para el aislamiento de hongos y levaduras tiene peptona, dextrosa y extracto de levaduras.

**Agar papa dextrosa (PDA):** al igual que el agar Sabouraud es ampliamente usado en el aislamiento de hongos, es una infusión de papa como fuente de almidones y la dextrosa es la fuente de energía, puede ser suplementado con antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano.

**Agar Rosa de Bengala Cloranfenicol:** Se utiliza para el aislamiento selectivo y la enumeración de levaduras y mohos de materiales y alimentos ambientales. El medio contiene peptona micológica que actúa como fuente de carbono, nitrógeno, minerales, vitaminas y otros nutrientes esenciales para el crecimiento.

**Agar mycosel:** es un medio selectivo que contiene peptona y dextrosa, además, tiene cicloheximida que inhibe el crecimiento de hongos ambientales y cloranfenicol que inhibe a la gran mayoría de Gram positivos y negativos, se emplea principalmente para el aislamiento de dermatofitos.

**Agar Czapeck:** se usa comúnmente para el cultivo de hongos y la formación de clamidosporas por *C. albicans*. Para el cultivo de organismos acidófilos, como las levaduras, la acidez del medio puede aumentar. También se usa para estudios taxonómicos de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Actinomyces*.

**Agar de infusión de cerebro-corazón:** es un medio de cultivo rico en minerales, nitrógeno, carbohidratos y vitaminas, se le puede adicionar antibióticos para hacerlo selectivo, este medio habitualmente se emplea para aislar patógenos.

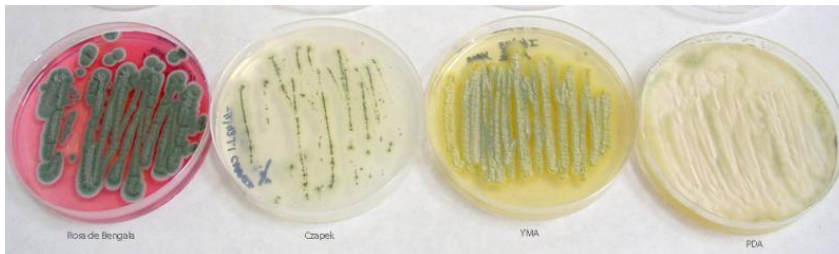


Imagen de hongo filamentoso *Penicillium* en diferentes medios de cultivo.

### Medios de enriquecimiento

Diversos tipos de microorganismos se pueden recuperar de sus hábitats naturales (agua, tierra, alimentos, etc.) si se crea en el laboratorio un medio ambiente artificial que favorezca el crecimiento de dichos microorganismos frente a otros microorganismos acompañantes. Para otorgarles dichas ventajas a los microorganismos de interés se tienen en cuenta las características fisiológicas a fin de diseñar el medio de cultivo y elegir las condiciones de incubación para favorecer su crecimiento frente a otros.

Como parte del enriquecimiento se intenta al mismo tiempo inhibir la mayor cantidad posible de microorganismos no deseados, de manera que estos no interfieran durante el aislamiento de los que sí interesan.

Un diagrama general para el enriquecimiento, aislamiento e identificación de microorganismos es el siguiente:

- Fuente de inóculo, caldo de enriquecimiento, siembra en medio sólido para aislamiento, cultivos stock, caracterización e identificación.
- Debemos realizar las siguientes consideraciones si deseamos detectar y aislar un determinado tipo de microorganismos y simultáneamente minimizar la interferencia de otros.
- Debemos elegir la muestra adecuadamente. El microorganismo que se está buscando debe ser factible de estar presente, ya sea si lo estamos buscando per se, o como contaminante.
- Debemos considerar si es útil someter a la muestra a un tratamiento previo. Cuanta mayor selección se realice en este paso inicial, menos selectivos deberán ser los medios de cultivo a utilizar. ¿Deberíamos comenzar con un enriquecimiento o sembrar la muestra directamente? Si el microorganismo que deseamos aislar está en un bajo número, se siembra la muestra en un caldo de cultivo que favorezca su multiplicación, este proceso se denomina enriquecimiento. Cuando un enriquecimiento se realiza en un medio formulado para frenar el desarrollo de microorganismos acompañantes no deseados, se denomina enriquecimiento selectivo. Un enriquecimiento selectivo aumenta las probabilidades de que el microorganismo que nos interesa se recupere como colonias aisladas cuando se realice el aislamiento a partir del medio de enriquecimiento.
- Debemos realizar una formulación adecuada del medio de aislamiento, o sea el medio donde pretendemos obtener colonias aisladas del microorganismo deseado. En general se utilizan medios de aislamiento selectivo. Dicha selectividad se puede determinar ya sea, a)- agregando un inhibidor de la flora acompañante, o b)- haciendo el medio restrictivo al incluir un nutriente que sólo algunos microorganismos (entre los cuales se encuentra el que deseamos aislar) sean capaces de utilizar.

-Debemos utilizar las condiciones de incubación adecuadas:

- Temperatura
- Requerimiento de O<sub>2</sub>
- Requerimiento de atmósfera con concentración de CO<sub>2</sub> aumentada
- Necesidad de luz

- Debemos aumentar la detección del microorganismo deseado lo antes posible en el proceso. Algunos grupos microbianos presentan características de cultivo y/o características morfológicas que nos ayudan a la hora de su detección.

Los componentes de los medios de cultivo se pueden manipular:

Fuente de **carbono**. A modo de ejemplo, se podrían quitar todos los compuestos orgánicos para permitir el crecimiento de microorganismos **autótrofos** que son capaces de obtener su fuente de carbono del CO<sub>2</sub> que difunde de la atmósfera al medio.

Fuente de **nitrógeno**. Nuevamente como un ejemplo, se podría no agregar ninguna fuente nitrogenada para permitir el crecimiento de los "fijadores de nitrógeno" que son capaces de obtener su fuente de nitrógeno del N<sub>2</sub> atmosférico.

Fuente de **energía**. Si no se agrega ningún compuesto capaz de ser utilizado como fuente de energía y se incuba a la luz, sólo crecerán los microorganismos fotosintéticos que usan la luz como fuente de energía. Se pueden agregar o no compuestos que sean utilizados como factores de crecimiento (vitaminas, aminoácidos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, etc.) según se necesiten o no.

### **Siembra y aislamiento de microorganismos anaerobios**

Para aislar microorganismos anaerobios que son rápidamente destruidos por el contacto con el oxígeno, una vez que la muestra ingresa al laboratorio debe ser procesada evitando su exposición al oxígeno atmosférico. Los medios de cultivo sólidos deben ser preparados inmediatamente antes de ser usadas para evitar una posterior difusión de oxígeno al medio. Por el mismo motivo, los medios líquidos deben ser regenerados por calentamiento a baño maría durante 10 min.

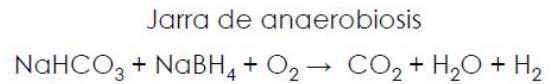
Los medios de cultivo que se utilizan contienen agentes reductores (convierten el O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O) como por ejemplo la cisteína, glucosa, tioglicolato. Algunos son tapados con agentes semisólidos (una capa de vaselina-parafina o agar al 0,5%) para evitar el acceso de aire. Otros medios contienen trozos de tejidos, lo que da una atmósfera reducida.

### Métodos para incubar en anaerobiosis

Puede recurrirse al uso de tubos con pirogalol o velas, pero más frecuentemente suelen usarse jarras anaerobias de las cuales existen varios tipos (Brewer, Torbal, Gas Pack, etc.). Generalmente todas ellas se basan en el mismo principio que es consumir el oxígeno del ambiente. El material de la jarra suele ser plástico, vidrio o metal. Tiene, además, una tapa que asegura el cierre hermético.

La generación de hidrógeno permite la reducción del oxígeno y da lugar a la formación de agua. Se utiliza el paladio como catalizador, el cual es inactivado con el ácido sulfhídrico, exceso de humedad y otros productos metabólicos volátiles de las bacterias. Al catalizador se lo puede reactivar en horno de calor seco a 160-170 C° durante dos horas.

Como indicador de óxido-reducción suelen utilizarse tiras de papel embebidas con azul de metileno, las cuales son incoloras en estado reducido, o azuladas cuando están oxidadas.



### Generadores de mezclas gaseosas:

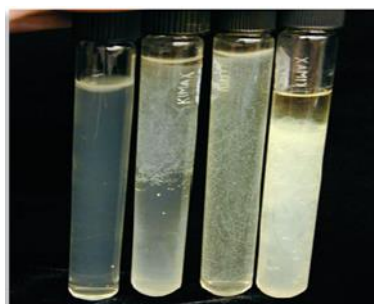
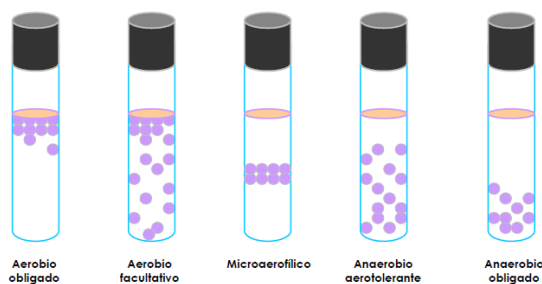
Sobres comerciales de Gas Pack: son de aluminio y contienen dos tabletas: a) Ácido cítrico y bicarbonato de sodio y b) borohidruro de sodio. Al hidratarse el sobre, la primera tableta libera CO<sub>2</sub> y la segunda H<sub>2</sub>. Si la jarra funciona bien al cabo de una hora existe menos del 1% de O<sub>2</sub>. Este sistema evita tener que utilizar tanques de H<sub>2</sub> o N<sub>2</sub>.

### **Medio caldo tioglicolato**

El caldo tioglicolato contiene 0,075 % de Ágar para evitar que las corrientes de convección transporten el oxígeno de la superficie a toda la masa del caldo. El ácido tioglicólico actúa como agente reductor, disminuyendo aún más el potencial de óxido-reducción del medio. La presencia de una importante variedad de nutrientes (caseína, extractos de levadura y carne, vitaminas, etc.) en el medio permite el desarrollo de la mayor parte de las bacterias. Hay distintas fórmulas modificadas en las que se han incluido otros componentes: un indicador de óxido-reducción (Resazurina), glucosa, vitamina K1 y hemina.

A continuación, puede observarse el comportamiento de los distintos microorganismos con distinta tolerancia o dependencia del oxígeno.

Crecimiento en medio fluido de Tioglicolato.



## Capítulo I.C

### Observación de los microorganismos

Cuando se quiere estudiar microorganismos, como primer paso, se realiza una observación de los mismos. Para ello debemos inocular el microorganismo a estudiar en un medio de cultivo adecuado e incubarlo durante un tiempo y temperatura conveniente dependiendo de las características metabólicas del mismo. Posteriormente, se realizan observaciones del cultivo o colonias, en el caso de utilizar medios sólidos, a nivel **macroscópico** y **microscópico**.

#### Observación macroscópica:















##### Observación en medios de cultivo líquidos:

- Enturbiamiento en toda la masa del cultivo.
- Desarrollo de grumos que se depositan en el fondo del tubo dejando el resto del medio de cultivo transparente.
- Desarrollo en la superficie formando un velo o película.
- Puede observarse aparición de color debido a la presencia de pigmentos en el medio de cultivo.

##### Observación en medios de cultivo sólidos:

- Colonias: cuando se cultiva una bacteria en la superficie de un medio sólido, cada microorganismo dará origen a una colonia que proviene de su multiplicación formando una masa de millones de bacterias (exactamente iguales genéticamente) observables a simple vista. La morfología de la colonia deriva de cada tipo de microorganismo y es una característica de la masa celular. Las características típicas para observar y registrar de cada colonia son:

- Tamaño: uniforme para cada especie o tipo, las dimensiones varían desde muy pequeñas o apenas visibles hasta unos cm de diámetro.
- Consistencia: blanda, seca o viscosa.
- Forma: depende del borde y del espesor. El borde puede ser liso, entero, ondulado, aserrado, etc. El espesor depende de la elevación pudiendo ser chatas, elevadas, convexas, cónicas, crateriformes, etc. De acuerdo a las características antes mencionadas pueden definirse distintos tipos de colonias.

Forma	Borde	Elevación	Superficie
Puntiforme 	Entero 	Plana 	Lisa o rugosa
Circular 	Ondulado 	Elevada 	Mate o brillante
Rizoide 	Lobulado 	Convexa 	Seca o cremosa
Irregular 	Filamentoso 	Crateriforme 	Invasiva o superficial
Filamentosa 		Acuminada 	

- Pigmentación: es una característica de algunas bacterias y su producción puede depender de las condiciones de crecimiento. Se los puede clasificar como:  
Cromóforos: el pigmento está contenido en el protoplasma y no colorea a la colonia ni al medio.  
Ejemplo: bacterias sulfuradas.

Paracromóforos: el pigmento está en la pared de la célula y por lo tanto la colonia aparece coloreada. Son pigmentos no difusibles y limitados a la bacteria y/o colonia. Ejemplo: *Staphylococcus aureus*.

Cromóparos: el pigmento es segregado al exterior de la célula y difunde al medio de cultivo, el cual resulta por lo tanto coloreado. Ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa*.

- **Olor:** algunas cepas desarrollan olores característicos que sirven de orientación en para identificación. Por ejemplo, algunas cepas del género *Streptomyces* producen el compuesto geosmina que posee olor característico a tierra mojada.
- **Hemólisis:** esta característica se observa en medios con sangre donde se forman halos alrededor de la colonia debido a la hemólisis de los glóbulos rojos. Esta hemólisis puede ser:
  - Beta: hemólisis total.
  - Alfa: hemólisis parcial.
  - Gamma: no hay hemólisis.



### Observación microscópica: Microscopio

El microscopio es un instrumento óptico que amplifica la imagen de un objeto pequeño. Mediante un sistema de lentes y fuentes de iluminación se puede hacer visible un objeto microscópico (es decir, que no se ve a simple vista). Las dos características principales de un microscopio son:

- **Aumento:** es una medida de la capacidad del microscopio de agrandar una imagen
- **Poder de resolución:** medida de la capacidad del microscopio para separar los diferentes puntos de una imagen.

El aumento en la mayoría de los microscopios resulta de una interacción compleja entre las ondas de la luz visible y la curvatura de la lente. Dependiendo del tamaño y la curvatura de la lente, la imagen aparece ampliada en un grado en particular, que se llama **aumento** y suele ser identificados con un número seguido del signo x.

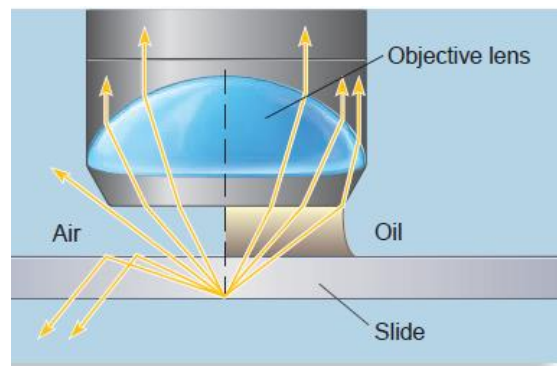
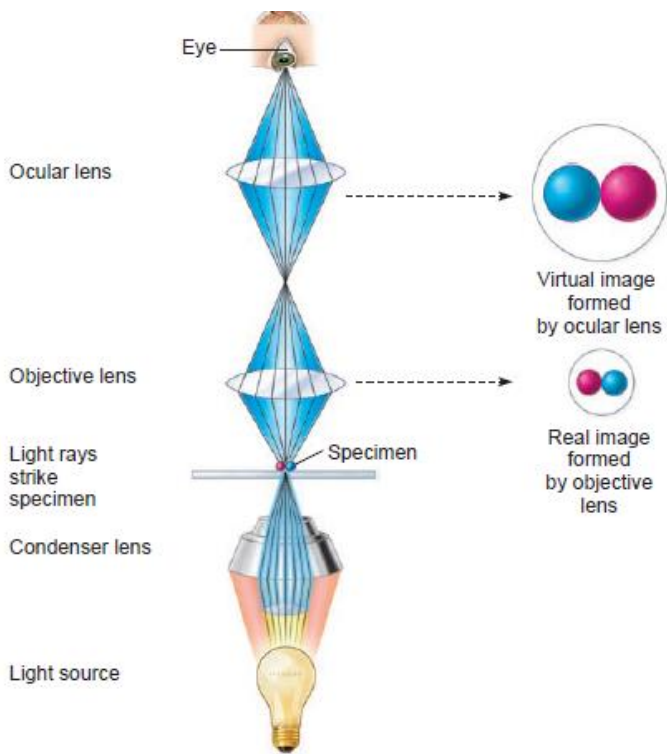
Los primeros microscopios eran simples como los desarrollados por Leeuwenhoek, lo que significa que contenían una sola lente de aumento y pocos elementos de trabajo. Entre los refinamientos que llevaron al desarrollo de los microscopios compuestos son: la adición de un segundo sistema de lentes de aumento, una lámpara en la base para emitir luz visible que ilumina la muestra, y una lente especial llamada **condensador** que converge o enfoca los rayos de luz a un único punto en el objeto.

**Poder del objetivo x poder del ocular = aumento total**

10x10x	=	100x
40x10x	=	400x
100x 10x	=	1000x

### Principios de la microscopía óptica.

La eficacia de un microscopio radica en su poder de ampliación adecuada, resolución, y claridad de imagen. La magnificación del objeto o espécimen de un microscopio compuesto se produce en dos etapas. La primera lente de este sistema (el más cercano a la muestra) es el **objetivo**, y la segunda (la más cercana al ojo) es el **ocular**. El objetivo forma la imagen inicial de la muestra, llamada imagen real. Cuando la imagen real se proyecta al plano de la lente ocular, la lente ocular magnifica para producir una segunda imagen, la imagen virtual. La imagen virtual es la que será recibida por el ojo y se convierte en la imagen visual. El poder de aumento del objetivo solo se extiende generalmente 4x hasta 100x, y el poder de los oculares de 10x a 20x.



La potencia total de magnificación de la imagen final formada por las lentes combinadas es el producto de los poderes separados de las dos lentes.

Los microscopios están equipados con un **revólver** de tres o más objetivos que se pueden girar en su posición según sea necesario. El poder del ocular generalmente permanece constante para un microscopio dado. Dependiendo de la potencia del ocular,

el total de magnificación de microscopios de luz estándar puede variar de 40x con el objetivo de potencia más bajo (llamado el objetivo de barrido) a 2.000x, con el objetivo de potencia más alto (el objetivo de inmersión en aceite).

**Resolución**

Además de magnificación (o aumento), un microscopio también debe tener una resolución adecuada, o poder de resolución. Resolución define la capacidad de un sistema óptico de distinguir dos objetos o puntos adyacentes entre sí. Por ejemplo, a una distancia de 25 cm, la lente del ojo humano puede resolver dos pequeños objetos como puntos separados con tal de que los dos objetos no estén más cerca de 0,2 mm. Debido a que los microorganismos son muy pequeños y por lo general están muy próximos entre sí, no se pueden ver con claridad a menos que las lentes del microscopio puedan resolverlos.

Una ecuación sencilla expresa los principales factores matemáticos que influyen en el poder de resolución.

$$\text{Poder de resolución} = \frac{\text{Longitud de onda (nm)}}{2 \times \text{Apertura numérica}}$$

A partir de esta ecuación, es evidente que el poder de resolución es una función de la longitud de onda de la luz que forma la imagen, junto con ciertas características del objetivo. La fuente de luz para los microscopios ópticos consiste en una banda de longitudes de onda de color en el espectro visible. Las longitudes de onda visibles más cortas están en la porción azul-violeta del espectro (400 nm), y las más largas están en la porción roja (750 nm). Debido a que la longitud de onda debe pasar entre los objetos que están siendo resueltos, las longitudes de onda más cortas (en el rango de 400 a 500 nm) proporcionarán una mejor resolución.

El otro factor que influye en la resolución es la apertura numérica (AN), una constante matemática derivada de la estructura física de la lente. Este número representa el ángulo de la luz producida por la refracción y es una medida de la cantidad de luz recogida por la lente. Cada objetivo tiene una apertura numérica fija que van desde 0,1 en el objetivo de menor poder hasta aproximadamente el 1,25 para los lentes de alta potencia (inmersión en aceite). Objetivos con AN más altas proporcionan

un mejor poder de resolución, ya que aumentan el ángulo de refracción y amplían el cono de luz que entra en el objetivo. Para que la lente de inmersión en aceite llegue a su máxima capacidad de resolución debe colocarse una gota de aceite entre la punta de la lente y la muestra sobre el portaobjetos de vidrio.

En términos prácticos, la lente de inmersión en aceite puede resolver cualquier célula o partes de célula, siempre y cuando sea de al menos  $0,2\ \mu\text{m}$  de diámetro; y puede resolver dos objetos adyacentes, siempre y cuando no estén más cerca de  $0,2\ \mu\text{m}$ . En general, los organismos que son  $0,5\ \mu\text{m}$  de diámetro o más se ven fácilmente. Esto incluye hongos y protozoos y algunas de sus estructuras internas, y la mayoría de las bacterias. Sin embargo, algunas bacterias y la mayoría de los virus son demasiado pequeños para ser resueltos por el microscopio óptico y requieren microscopía electrónica. El factor que más limita la claridad de la imagen de un microscopio es su poder de resolución. Incluso si un microscopio de luz es diseñado para magnificar varios miles de veces, su poder de resolución no se podría aumentar.

A pesar de este límite, son posibles pequeñas mejoras a la resolución. Una de ellas es colocar un filtro azul sobre la lámpara del microscopio, manteniendo la longitud de onda en el valor más corto posible. Otra proviene de la maximización de la apertura numérica. Ese es el efecto de añadir aceite a la lente de inmersión, lo que aumenta eficazmente el NA de 1.25 o 1.4 y mejora el poder de resolución a  $0,17\ \mu\text{m}$ .

### **Variaciones sobre el microscopio óptico**

Con adaptaciones especiales en las lentes, condensadores y fuentes de luz, cuatro tipos especiales de microscopios se pueden describir: campo brillante, campo oscuro, de contraste de fase, y de interferencia. Un quinto tipo de microscopio óptico, el microscopio de fluorescencia, usa radiación ultravioleta como fuente de iluminación, y sexto, el microscopio confocal, utiliza un haz láser. Cada uno de estos microscopios se adapta para ver muestras de una manera particular.

### **Microscopio de campo claro**

El microscopio de campo claro es el tipo más utilizado de microscopio óptico. A pesar de que normalmente vemos objetos tales como las palabras en esta página con luz reflejada en la superficie, un microscopio de campo claro forma su imagen cuando la luz se transmite a través de la muestra. La muestra, siendo más densa y más opaca que sus alrededores, absorbe parte de esta luz, y el resto de la luz se transmite directamente a través del ocular en el campo. Como resultado, la muestra producirá una imagen que es más oscura que el campo circundante brillantemente iluminada. El microscopio de campo claro es un instrumento multiuso que se puede utilizar tanto para muestras frescas como muestras fijas y teñidas. Debido a que los microorganismos son transparentes es difícil distinguirlos con este tipo de microscopía, debido a esto es que se suelen teñir.

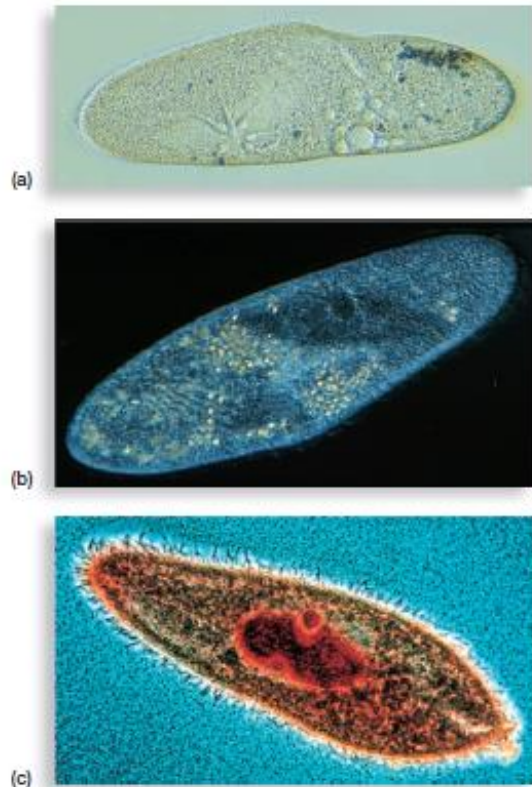
### **Microscopía de campo oscuro**

Un microscopio de campo oscuro está equipado con un condensador especial que ilumina la muestra con luz fuerte indirecta. El objeto iluminado dispersa la luz y así se hace visible contra el fondo oscuro que tiene detrás. Por ello las porciones transparentes del microorganismo quedan oscuras, mientras que las superficies y partículas se ven brillantes, por la luz que reciben y dispersan en todas las direcciones, incluida la del eje óptico que conecta el microorganismo con la pupila del observador. Esta forma de iluminación se utiliza para analizar elementos biológicos transparentes y sin pigmentar, invisibles con iluminación normal, sin fijar la muestra, es decir, sin que los microorganismos mueran.

### Microscopía de contraste de fase

Los componentes internos de una célula viva, sin teñir también carecen de contraste suficiente para distinguirlos fácilmente. Pero las estructuras celulares difieren ligeramente en densidad, lo suficiente para que puedan alterar la luz que pasa a través de ellos de manera sutil. El microscopio de contraste de fase contiene dispositivos que transforman los cambios sutiles en las ondas de luz que pasan a través de la muestra en diferencias en la intensidad de la luz. Por ejemplo, las partes celulares más gruesas tales como orgánulos alteran la vía de la luz en mayor medida que las regiones más delgadas tales como el citoplasma. La cantidad de detalles internos visibles por este método es mayor que por cualquiera de campo brillante o métodos de campo oscuro. El microscopio de contraste de fase es más útil para la observación de las estructuras intracelulares tales como esporas bacterianas, gránulos, y orgánulos, así como las estructuras del aparato locomotor de células eucariotas.

- a) Imagen obtenida con microscopio de campo claro. b) Imagen obtenida con microscopio de campo oscuro. c) Imagen obtenida con microscopio de contraste de fases.



### Microscopía de fluorescencia

El microscopio de fluorescencia es un microscopio compuesto montado con una de fuente de radiación ultravioleta (UV) y filtros que protegen el ojo del observador de lesión por estos rayos peligrosos. El nombre para este tipo de microscopía se basa en el uso de ciertos colorantes (acridina, fluoresceína) y minerales que poseen fluorescencia. La muestra se tiñe con una sustancia fluorescente que absorbe la energía de las ondas cortas de la luz (azul) y emite la luz de longitudes de ondas más largas (verde). Se utiliza en inmunofluorescencia, técnica en la cual una sustancia fluorescente se une a un anticuerpo específico de ciertos microorganismos. Si el anticuerpo fluorescente se une al microorganismo, este microorganismo emite fluorescencia y se puede identificar. Esta técnica se usa en clínica. Una nueva tecnología que utiliza la tinción de los ácidos nucleicos fluorescentes puede diferenciar entre células vivas y muertas en las mezclas o detectar células en cultivos. Un microscopio de fluorescencia puede ser útil para la localización de los microbios en mezclas complejas, porque sólo las células diana serán detectadas.

### Microscopía confocal

Los microscopios ópticos pueden ser incapaces de formar una imagen clara cuando las muestras son demasiado gruesas para las lentes convencionales. Esto puede ocurrir en células grandes con estructuras internas complejas. Un nuevo tipo de microscopio que supera este impedimento se llama el microscopio confocal de barrido. Este microscopio utiliza un haz de luz láser para escanear varias profundidades en la muestra y ofrecer una imagen nítida que se centra en un solo plano. Se utiliza con más frecuencia en muestras con teñidas con colorantes fluorescentes y también puede utilizarse para visualizar las células y tejidos no teñidas in vivo.

## Partes de un microscopio óptico



### Sistema óptico

**Ocular:** Lente situada cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.

**Objetivo:** Lente situada cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta.

**Condensador:** Lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.

**Diafragma:** Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.

**Foco:** Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

### Sistema mecánico

**Soporte:** Mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.

**Platina:** Lugar donde se deposita la preparación.

**Cabezal:** Contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular, binocular.

**Revólver:** Contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite, al girar, cambiar los objetivos.

**Tornillos de enfoque:** Macrométrico que aproxima el enfoque y micrométrico que consigue el enfoque correcto.

## Manejo y uso del microscopio óptico

- 1) Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente.
- 2) Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
- 3) Comenzar la observación con el objetivo de 4x o colocar el de 10x si la preparación es de bacterias.
- 4) Para realizar el **enfoque**:
  - a) Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.
  - b) Mirando, ahora sí, a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el macrométrico y, cuando se observe algo nítida la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
  - c) Pasar al siguiente objetivo. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación.
- 5) Empleo del **objetivo de inmersión**:
  - a) Bajar totalmente la platina.
  - b) Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que echar el aceite.
  - c) Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
  - d) Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión (100x).
  - e) Mirando directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.

- f) Enfocar cuidadosamente con el micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40x por lo que el riesgo de accidente es muy grande.
- g) Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite.
- h) Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.
- i) Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica.

### **Mantenimiento y precauciones**

- Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresalga del borde de la misma. Dejarlo cubierto con su funda.
- Cuando no se está utilizando el microscopio, hay que mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se va a usar de forma prolongada, se debe guardar en su caja dentro de un armario para protegerlo del polvo.
- Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica.
- No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
- Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso, se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el objetivo, hay que limpiarlo con una mezcla de alcohol-acetona (7:3). No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción.
- No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
- El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra. No cambiar nunca de objetivo agarrándolo por el tubo del mismo ni hacerlo mientras se está observando a través del ocular.
- Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño. Si se mancha de aceite, limpiarla con un paño humedecido en xilol.
- Es conveniente limpiar y revisar siempre los microscopios al finalizar la sesión práctica y, al acabar el curso, encargar a un técnico un ajuste y revisión general

### **Preparación de las muestras para microscopios ópticos**

Una muestra para microscopía óptica se prepara generalmente mediante el montaje de una muestra en un portaobjeto de vidrio perfectamente limpio, desengrasado y seco. La manera en que una muestra se prepara depende de:

- 1) la condición de la muestra: es decir si viene de un cultivo líquido o una colonia en medio sólido;
- 2) los objetivos del examinador: es decir si se desean observar estructuras en general, identificar los microorganismos, o ver movilidad.
- 3) el tipo de microscopía disponible: de campo brillante, campo oscuro, contraste de fase o fluorescencia.

### **Preparaciones del extendido en estado fresco.**

Para las muestras vivas o frescas de microorganismos se utilizan preparaciones húmedas de modo que puedan ser observados en su estado natural. Las células se suspenden en un fluido adecuado (agua, caldo, solución salina) que mantiene temporalmente la viabilidad y proporciona espacio y un

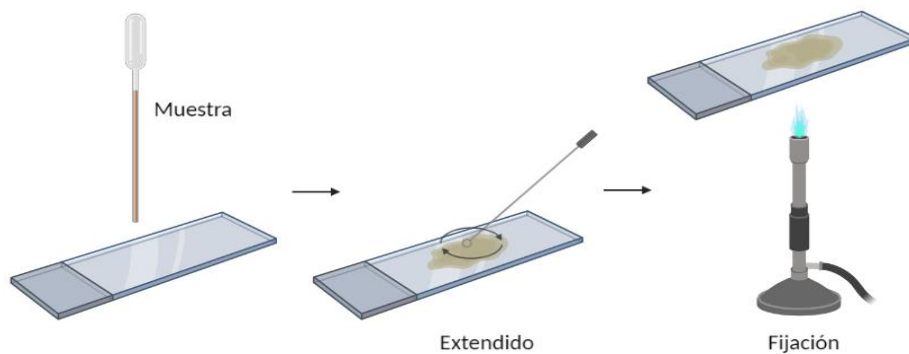
medio para la locomoción. Una preparación en fresco se prepara con una o dos gotas (10-20  $\mu$ l) del cultivo líquido que se colocan en un portaobjeto mediante ansa o pipeta y superpuesta con una cubierta de vidrio o cubreobjeto. También puede lograrse colocando una gota de solución salina en un portaobjeto y posteriormente una porción de colonia de la bacteria en cuestión por medio de un ansa o hilo extendiéndola en forma pareja. Aunque esta preparación es rápida y fácil de hacer, tiene ciertas desventajas. La cubierta de vidrio puede dañar las células de mayor tamaño, es muy susceptible a secado y puede contaminar los dedos del manipulador.

#### Preparaciones del extendido en estado fresco

### Fijación de muestras

La principal dificultad al observar microorganismos al microscopio óptico es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea, y el método más simple de aumentar el contraste es la utilización de colorantes. Para la aplicación de colorantes es necesario fijar la muestra previamente. Esta operación tiene por objeto matar las bacterias lo que vuelve su membrana más permeable a los colorantes y fijar la estructura citológica adhiriéndola al portaobjeto. Se trata entonces de coagular el protoplasma y precipitar las proteínas que forman la materia viva, evitando su deformación. La fijación puede ser realizada por: calor, alcohol o una mezcla alcohol:éter.

1) Fijación por calor: consiste en aproximar el portaobjeto pasándolo rápidamente dos o tres veces a la llama del mechero. Este método es poco preciso y puede producir modificaciones en la bacteria.



2) Fijación por alcohol flameado: consiste en colocar 4 o 5 gotas de alcohol de 96° sobre el portaobjeto y flamearlo. La operación debe durar poco segundos, de lo contrario se producen los mismos inconvenientes que en el método anterior.

3) Fijación por alcohol:éter: consiste en cubrir el preparado con una mezcla de partes iguales de alcohol de 96° y éter; después de dos o tres minutos, eliminar el exceso de líquido y dejar secar ayudándose si es necesario por calor débil.

### Coloración

El uso de colorantes puede emplearse para distinguir entre tipos de células diferentes o para revelar la presencia de determinados componentes celulares, tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, centros de actividad respiratoria, etc.

Los métodos de tinción son de gran utilidad, pero deben usarse siempre con precaución, ya que pueden conducir a errores. Las moléculas de colorante forman en ocasiones precipitados o agregados que parecen estructuras celulares auténticas, pero que son formaciones completamente artificiales inducidas por el mismo colorante. Tales estructuras se denominan artefactos, y deben tomarse precauciones para tener la seguridad de que no nos estamos equivocando al creer que un artefacto es una estructura realmente existente.

Todas las técnicas de coloración requieren tres operaciones principales: preparación del extendido, fijación y la coloración propiamente dicha. Las coloraciones pueden ser de diferentes tipos: simples, dobles o especializadas. También existe un tipo de tinción que se denomina tinción negativa.

Coloración simple: Consisten en hacer actuar sobre el extendido un solo colorante, que impregna uniformemente todas las bacterias presentes. El extendido, secado y fijado, es cubierto con la solución del colorante. Se usa generalmente Azul alcalino de Loeffler formado por:

- Azul de metileno 1g
- Alcohol de 96° 30 ml
- Solución acuosa de KOH al 1% 100 ml

Después de 2 a 5 minutos de acción, el exceso de colorante es eliminado y el portaobjetos se lava suavemente con agua. Las bacterias se colorean en color azul oscuro.

El lavado con agua debe ser abundante y efectuado hasta que el extendido no ceda más colorante. El portaobjetos debe estar absolutamente seco antes de agregar el aceite de inmersión para su observación. Otros colorantes que se usan en técnicas de coloraciones simples son: fucsina básica, violeta de genciana, rojo neutro y otros. En la figura se observan los pasos generales de una coloración simple: Extensión, fijación, adición del colorante, lavado, y secado al aire.

Coloraciones dobles o diferenciales: Estas coloraciones consisten en hacer actuar sucesivamente dos soluciones de colorantes con el fin de obtener un efecto neto de contraste. Hay muchas técnicas de doble coloración que se usan en microbiología ya sea para poner en evidencia una forma bacteriana o para identificar una determinada estructura celular. Uno de los métodos más utilizados es la coloración Gram y la Ziehl-Neelsen para distinguir entre distintas formas bacterianas.

Coloraciones especializadas: Se utiliza para identificar y estudiar determinadas estructuras que pueden estar presentes en los microorganismos. En las tinciones estructurales se colorea únicamente una parte de la célula. Se utilizan este tipo de tinciones para poner en evidencia la presencia de cápsulas, endosporas (Método Shaeffer y Fulton), flagelos o compuestos intracelulares (almidón, polifosfato, etc.).

Tinción negativa: es el reverso del procedimiento de tinción usual: las células se dejan sin teñir, y se colorea el medio que las rodea. Lo que se ve, es el perfil de las células. La sustancia utilizada para la tinción negativa es un material opaco que no tiene afinidad por los constituyentes celulares y que simplemente rodea las células, tal como la **tinta china** (que es una suspensión de partículas de carbono coloidal) o la **nigrosina** (un colorante negro insoluble en agua). La tinción negativa es un modo satisfactorio de aumentar el contraste de las células en la microscopía óptica, pero su máxima utilidad está en revelar la presencia de cápsulas alrededor de las células bacterianas.

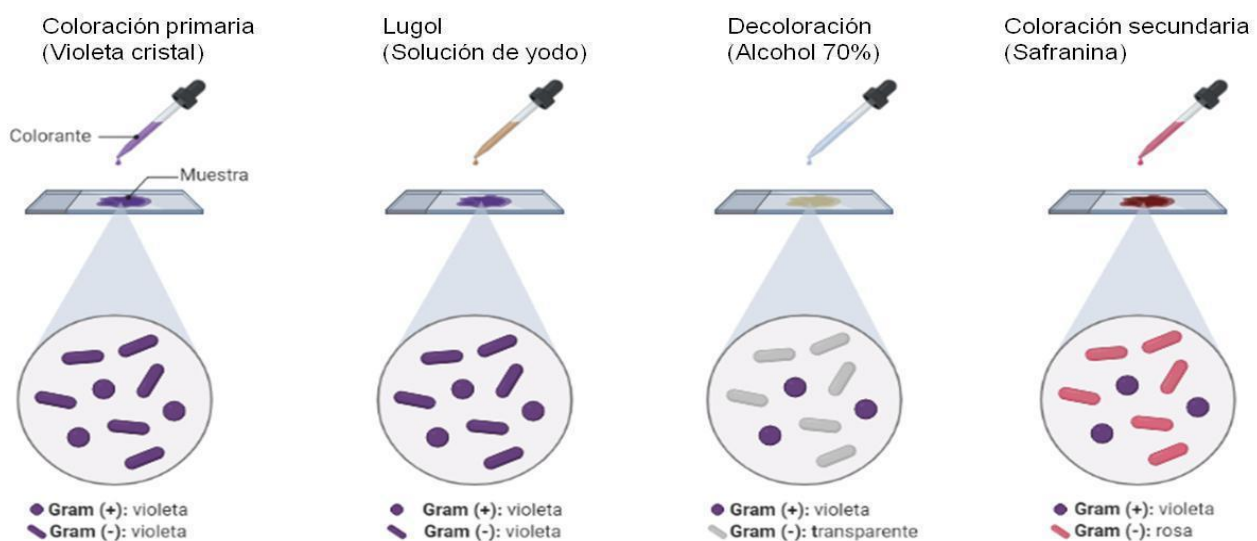
### **Método de Gram**

Las diferencias estructurales entre las paredes celulares de las bacterias fundamentan el comportamiento diferencial frente a la tinción por el método de Gram.

#### Pasos a seguir:

- 1) Se coloca sobre la muestra un colorante violeta (violeta de metilo, cristal violeta, violeta de genciana) que reacciona con todas las células bacterianas, coloreándolas de azul oscuro.
- 2) Luego se lava con agua.
- 3) Se cubre el extendido con lugol, un mordiente que incrementa la afinidad entre el primer colorante y las células. El mordiente (solución diluida de yodo) se combina con el colorante para formar un compuesto insoluble coloreado en el interior de la célula.
- 4) Se vuelve a lavar con agua.

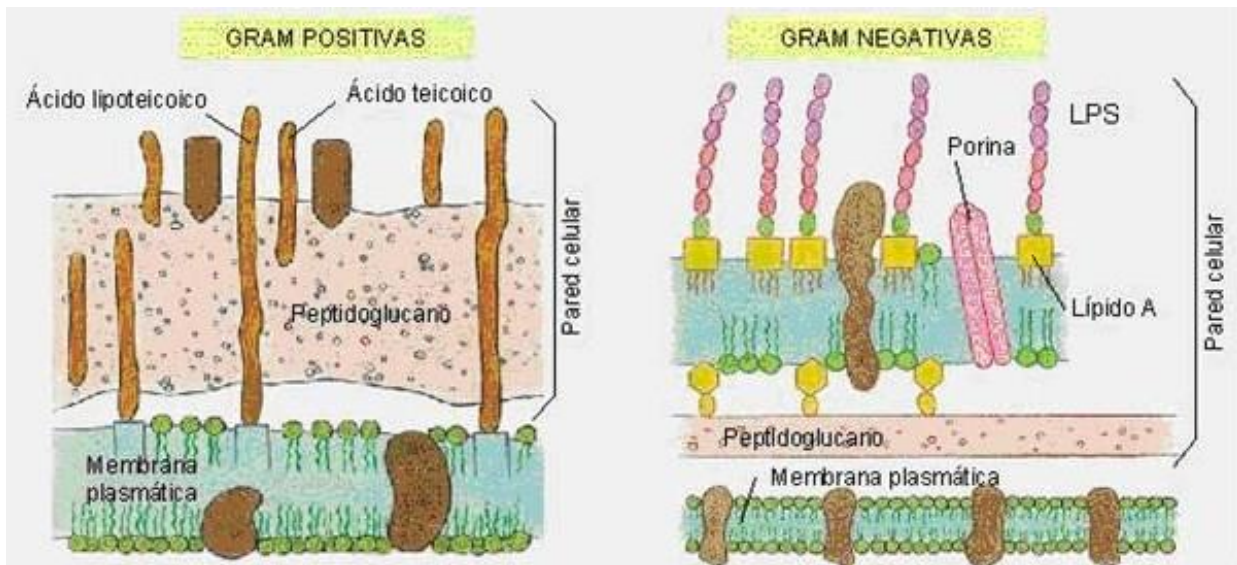
- 5) Se procede a decolorar con etanol de 95% o la mezcla alcohol-acetona (1:1), que son disolventes orgánicos capaces de eliminar el primer colorante de algunas bacterias, decolorándolas. La decoloración puede ser considerada como el paso más crítico del método de Gram. Una decoloración demasiado intensa como una decoloración insuficiente conduce a serios errores. El alcohol etílico es el agente decolorante más empleado. Si el grado alcohólico baja de 80° aumenta su poder decolorante, en consecuencia, debe tenerse cuidado con la cantidad de agua que pueda quedar sobre el extendido en el momento de efectuar la decoloración también puede usarse acetona como decolorante; su acción es más rápida que la del alcohol y debe usarse con precaución. Por lo general se usa una mezcla de acetona con alcohol (4 partes de alcohol y 1 parte de acetona).
- 6) En último término se coloca un colorante de contraste, igualmente de carácter básico, pero de distinto color que el primer colorante, que teñirá sólo a las bacterias decoloradas en el paso anterior. Generalmente se suele utilizar la fucsina o la safranina de color rosa, que contrastan con el color violeta del primer colorante.



### Fundamento de la coloración de Gram

Los organismos que resisten la decoloración y retienen el complejo cristal violeta-yodo aparecerán de color violeta oscuro al microscopio, y se denominan Gram positivos. Aquellos que pierden el color inicial del cristal violeta tras la decoloración, se clasifican como Gram negativos y toman el color rosa debido al segundo colorante.

Luego de aplicar el primer colorante y el lugol, en el interior de la bacteria se forma un complejo entre el cristal violeta y el yodo, que es insoluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos. Este complejo es fácilmente extraído en bacterias Gram negativas, y no en las bacterias Gram positivas. Esto se debe a que la pared de la célula Gram (+) es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano (mureína) así como de ácido teicoico; generalmente el 80%-90% de la pared de la célula Gram (+) es peptidoglicano. Al deshidratarse por acción del alcohol se cierran los poros disminuyendo así el espacio entre las moléculas y provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular. Las bacterias quedan teñidas de color violeta. La pared de la célula Gram (-), por otro lado, contiene una capa mucho más delgada (sólo el 10% - 20% de la pared es peptidoglicano), y está rodeada por una membrana exterior de lipopolisacáridos y proteínas, que no constituyen una barrera para el pasaje de los solventes orgánicos. El alcohol desorganiza y disuelve la capa lipídica más externa penetrando fácilmente, y disuelve el complejo violeta-iodo. La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora.



La capacidad de retener el colorante primario de las bacterias Gram positivas está influenciada por la edad del cultivo. Por esta razón a la hora de hacer una tinción de Gram es muy importante trabajar con cultivos frescos. De hecho, puede ocurrir que un cultivo de bacterias Gram positivo (es decir con la capacidad de retener el complejo entre el cristal violeta y el yodo debido a las características de su pared celular) lo veamos de color rosa, como si fuese “Gram negativo”. Esto se debe a que un microorganismo Gram positivo debe presentar una pared celular sana. Muchas veces los cultivos donde las células se encuentran en fase estacionaria o fase de muerte han sufrido un daño de la pared que hace que pierdan la capacidad de retener el colorante. Esto implica que si no utilizamos cultivos frescos para realizar una tinción de Gram podemos obtener resultados erróneos.

### Técnica de coloración de Ziehl-Neelsen

Los bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR) como *Corynebacterium* o las *Mycobacterium* son largos y finos y aparecerán en grupos, teñidos de color rojo, completamente saturados con la fucsina. Los otros organismos que no son ácido alcohol resistentes pierden la fucsina en los lavados, y aparecerán de color azul tras la tinción del contraste. En este método se utiliza como colorante primario fucsina fenicada de Ziehl al 1%. El diferenciador es una mezcla de 95 ml alcohol y 5 ml ácido nítrico. Luego se aplica el colorante secundario azul de metileno al 3% en agua destilada. También puede usarse como colorante de fondo amarillo de metilo al 0,2% en agua.

### Coloración de cápsulas

Las cápsulas son estructuras producidas por algunas bacterias bajo determinadas condiciones ambientales que juegan un papel importante en la patogenicidad del microorganismo, interfiriendo con la acción fagocítica de los leucocitos.

Por su composición química no se tiñen normalmente con colorantes básicos, como cristal violeta o safranina, y por eso exige el empleo de métodos de coloración especiales. Algunos métodos están destinados a colorear la célula y el fondo, pero no la cápsula, de manera que la envoltura se aprecia por contraste. Otros procedimientos producen un efecto colorante diferencial, cuando la cápsula admite un contracolorante. Otra técnica utiliza el principio de la coloración negativa con tinta china o nigrosina, en el que se ven las cápsulas como un halo claro contra un fondo oscuro.

Las cápsulas, al estar constituidas por polímeros coloidales muy hidratados, se distorsionan con facilidad y se contraen en los pasos de desecación y fijación, por lo que es conveniente hacer la

observación de las mismas utilizando la técnica del examen fresco. En éste, las cápsulas aparecen bajo la forma de un halo claro, brillante, rodeando a las bacterias.

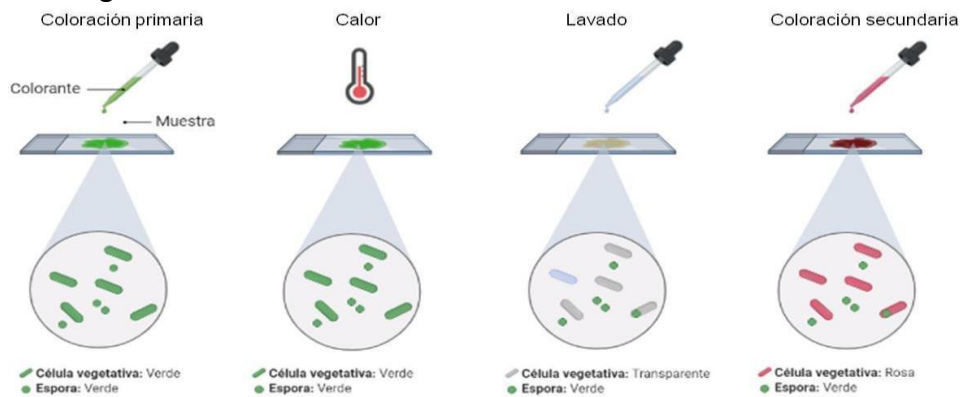
### Método de Burri

En el extremo de un portaobjetos bien desengrasado colocar una gota de tinta china especial para bacteriología y una gota de igual volumen de cultivo líquido o de una emulsión, si es cultivo sólido. Mezclar con el ansa y extender con el borde de un portaobjetos o colocar inmediatamente un cubreobjetos fino, dejando que el líquido se extienda para formar debajo del mismo una película delgada, evitando que se formen burbujas. Se puede presionar el mismo con un papel de filtro hasta obtener una capa fina del material que se va a observar, absorbiendo el papel secante el exceso de la muestra. Examinar inmediatamente con objetivo de inmersión en aceite, reduciendo la luz, bajando el condensador.

Las cápsulas se observan como un halo claro sobre un fondo oscuro. El fundamento de este método consiste en que la cápsula desplaza a las partículas de carbono coloidal de la tinta china y aparece como un halo claro alrededor de los microorganismos.

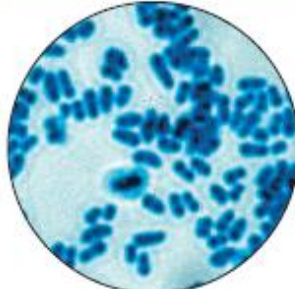
### Técnica de la coloración de esporas de Shaeffer y Fulton

Las endosporas son estructuras que se forman en el interior de ciertos tipos de bacterias, entre los que destacan las pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. A diferencia de la célula vegetativa de la que procede, la endospora es resistente a factores ambientales adversos: altas temperaturas, compuestos químicos tóxicos y también a los colorantes. Sin embargo, existen colorantes como el verde de malaquita que, con ayuda del calor, pueden penetrar en ella. Una vez teñidas, no perderán el colorante en el lavado con agua y sí lo harán las formas vegetativas, que quedarán teñidas con el colorante de contraste. La posición y morfología de las esporas en el interior de la bacteria tiene interés taxonómico, ya que es de utilidad para diferenciar especies dentro de un mismo género.



### Tipos de Tinciones

(a) **Simple and Negative Stains**  
Use one dye to observe cells

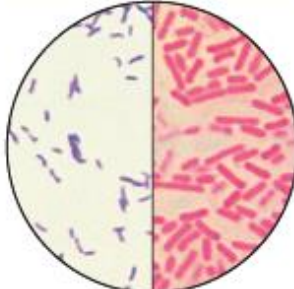


Methylene blue stain of *Corynebacterium* (1,000x)

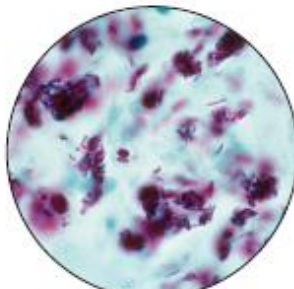


Negative stain of spirilla bacteria made with nigrosin (500x)

(b) **Differential Stains**  
Use two dyes to distinguish between cell types



Gram stain  
Purple cells are gram-positive.  
Red cells are gram-negative (1,000x).

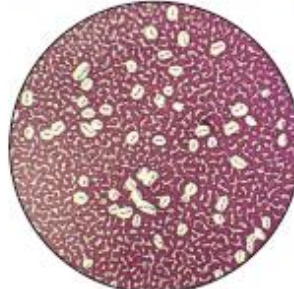


Acid-fast stain  
Red cells are acid-fast.  
Blue cells are non-acid-fast (750x).

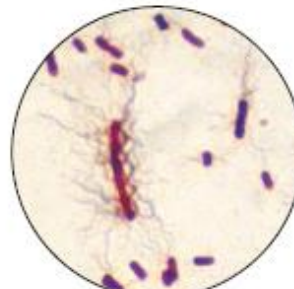


Spore stain, showing spores (green) and vegetative cells (red) (1,000x)

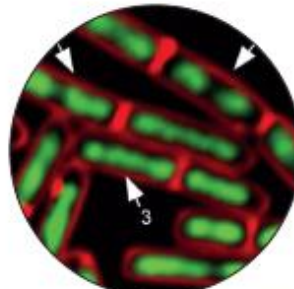
(c) **Structural Stains**  
Special stains used to enhance cell details



Capsule stain of rod-shaped bacterium (1,000x).



Flagellar stain of *Proteus vulgaris*.  
Note the fine fringe of flagella (1,500x)



Fluorescent stains of bacterial chromosome (green) and cell membrane (red) (1,500x)

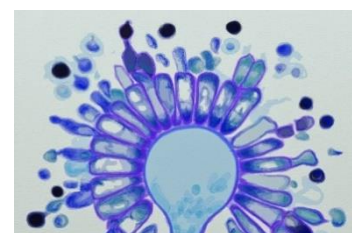
(a) Tinciones simples y tinciones negativas. (b) Tinciones diferenciales: Gram, ácido resistente y esporas. (c) Tinciones estructurales: cápsula, flagelar y cromosómica. La tinción de esporas (a la derecha) es un método que se ajusta tanto a las categorías diferenciales como estructurales.

### Coloración de hongos con Azul de Lactofenol

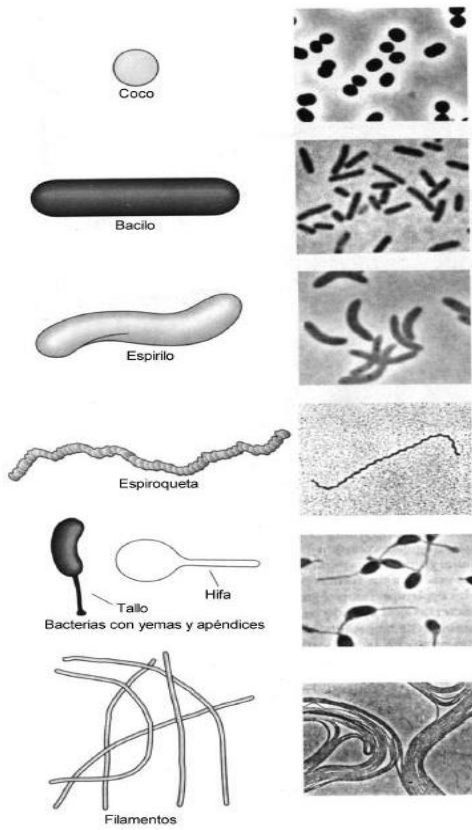
La tinción con Azul de Lactofenol (también llamado colorante Gueguén) es utilizada para observar microscópicamente las estructuras fúngicas. El azul de algodón se une a la quitina presente en la pared celular de los hongos, tiñéndola de color azul. Además, el fenol presente en la solución de tinción elimina otros microorganismos y el ácido láctico actúa como preservante de las estructuras fúngicas.

#### Pasos a seguir:

1. Colocar 2 gotas del colorante sobre el portaobjetos.
2. Tomar la muestra con un ansa y depositarla en el portaobjetos (En el caso de hongos filamentosos la muestra puede tomarse con el lado adhesivo de una cinta de papel)
3. Si es necesario, agregar más colorante
4. Colocar un cubreobjetos y observar al microscopio óptico



## Morfología de procariotas



*Thiocapsa roseopersicina*

*Desulfuromonas acetoxidans*

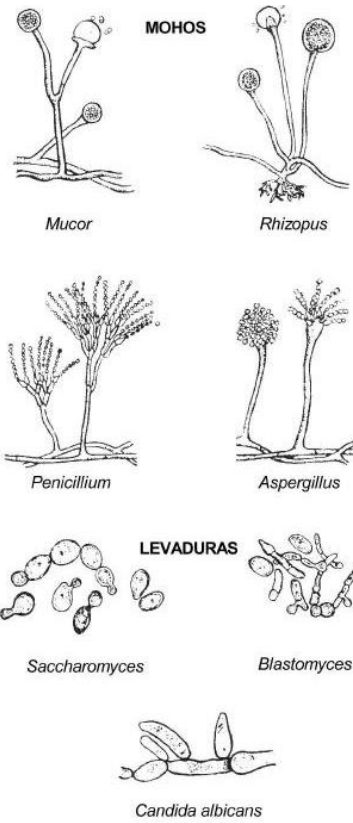
*Rhodospirillum rubrum*

*Spirochaeta stenostrepa*

*Rhodomicrobium vannielii*

*Chloroflexus aurantiacus*

## Morfología de algunos hongos



MOHOS

*Mucor*

*Rhizopus*

*Penicillium*

*Aspergillus*

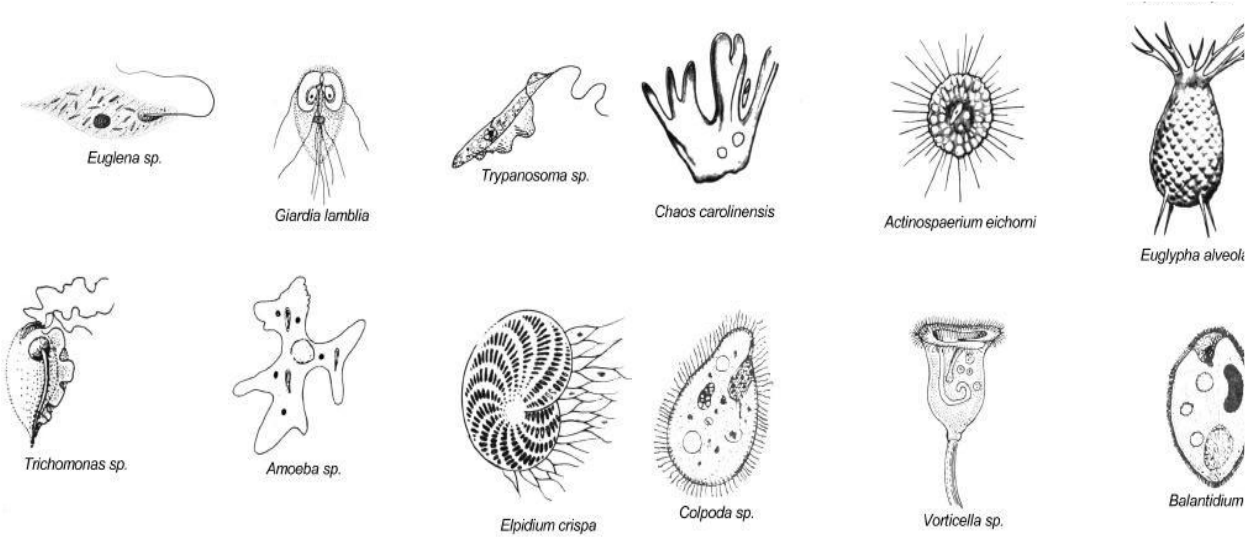
LEVADURAS

*Saccharomyces*

*Blastomyces*

*Candida albicans*

## Morfología de protozoarios



## Capítulo II.A

### Nutrición y metabolismo bacteriano

La nutrición es el proceso por el que los seres vivos toman las sustancias químicas que necesitan del medio donde habitan para poner en marcha su metabolismo, crecer y dividirse. Dichas sustancias se denominan nutrientes, y se requieren para dos objetivos:

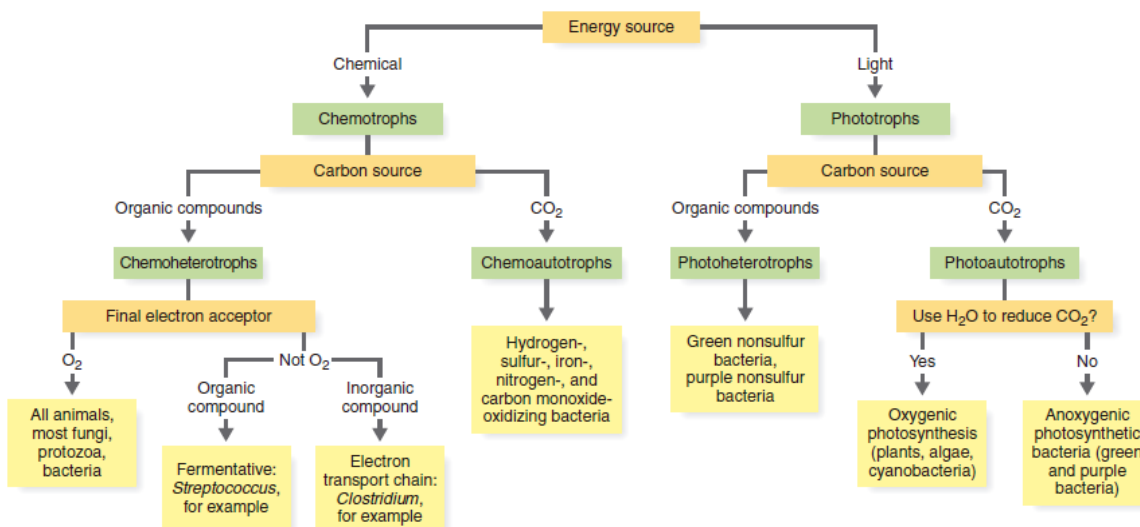
- Fines energéticos: reacciones de mantenimiento
- Fines biosintéticos: reacciones plásticas o anabolismo

#### Categorías nutricionales de los microbios respecto de la fuente de Energía y Carbono

La biosíntesis de nuevos componentes celulares es un proceso que requiere energía procedente del medio ambiente. Todo microorganismo necesita para vivir una fuente de carbono, una fuente de energía y un dador de electrones. Según de dónde obtenga estos requerimientos, pueden clasificarse en:

	FUENTE	DENOMINACION	POSIBLE FUENTE
FUENTE DE ENERGIA	Lumínica	FOTOSINTETICO	Luz del sol
	Química	QUIMIOSINTETICO	Productos químicos inorgánicos simples
DADOR DE ELECTRONES	Inorgánico	LITOTRÓFO	SH <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , Fe
	Orgánico	ORGANOTRÓFO	Hidratos de carbono, lípidos, hidrocarburos, proteínas, alcoholes
FUENTE DE CARBONO	Inorgánico	AUTOTRÓFO	CO <sub>2</sub>
	Orgánico	HETEROTRÓFO	Glucosa, Aminoácidos, Acetato

Categoría/Fuente de Carbono	Fuente de energía	Ejemplo
FOTOAUTOTROFO	Luz del sol	Los organismos fotosintéticos, como las algas, plantas, cianobacterias
QUIMIOAUTOTROFO	Productos químicos inorgánicos simples	Sólo ciertas bacterias, como metanógenos, bacterias ventilación de aguas profundas
QUIMIOHETEROTROFO	Conversión metabólica de los nutrientes procedentes de otros organismos	Protozoos, hongos, muchas bacterias, animales
FOTOHETEROTROFO	La luz del sol o de la materia orgánica	Bacterias púrpuras y verdes fotosintéticas



- Mixótrofas son aquellas bacterias con metabolismo energético litótrofo (obtienen energía de compuestos inorgánicos), pero requieren sustancias orgánicas como nutrientes para su metabolismo biosintético. Esos organismos pueden utilizar la luz como una fuente de energía, o

tomarla de compuestos orgánicos o inorgánicos. También se incluye en este grupo los procariotas que obtienen energía de la oxidación de compuestos inorgánicos pero que utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono.

### **Análisis químico de los microorganismos**

Para obtener una idea del requerimiento nutricional de un microorganismo es interesante analizar su composición química. La siguiente lista es un breve resumen de algunos patrones nutricionales de la bacteria intestinal *Escherichia coli*. Algunos nutrientes se absorben del medio ambiente mientras que otros deben ser sintetizados por la célula a partir de compuestos simples.

- El contenido de agua es el más alto de todos los componentes (70%).
- Alrededor del 97% del peso seco de los microorganismos se compone de compuestos orgánicos.
- Las proteínas son el compuesto orgánico más prevalente.
- Se necesitan elementos químicos en el esquema general del crecimiento celular, pero la mayoría de ellos están disponibles para la célula como compuestos y no como elementos puros.
- Una célula "simple" como *E. coli* contiene del orden de 5.000 compuestos diferentes, sin embargo, necesita absorber sólo unos pocos nutrientes para sintetizar esta gran diversidad.

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, Fe.
- 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<sub>2</sub> 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 distintos tipos de nutrición, desde bacterias metilótrofas que sólo usan metano o metanol como fuente de carbono y energía, hasta las muy versátiles *Pseudomonas*, que pueden llegar a degradar más de 100 tipos de compuestos 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.

Aunque dentro del mundo de los procariotas se encuentre tanta variedad nutricional, las bacterias que pueden nutrirse solamente de sustancias inorgánicas sencillas (H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 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 quimiolitioautótrofos): obtienen su energía de la oxidación de sustancias inorgánicas sencillas, el carbono procede del CO<sub>2</sub>, 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 del medio ciertos compuestos más complejos, ya que carecen de ciertas rutas biosintéticas.

### **Clases de nutrientes**

Podemos clasificar los nutrientes en las siguientes categorías:

- Universales: agua, CO<sub>2</sub>, fosfatos y sales minerales
- Particulares: compuestos de N y S
- Factores de crecimiento: vitaminas y cofactores

## Nutrientes universales

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 o sustrato resultante de algunas reacciones bioquímicas.

Las fuentes de agua pueden ser:

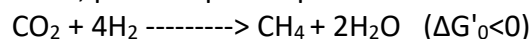
- endógena: procedente de procesos de óxido-reducción;
- exógena (la más importante): procedente del medio, y que difunde a través de las membranas.

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 inaccesibles a la bacteria.
- Los solutos disueltos en agua (ej. sales, azúcares) tienen afinidad por las moléculas de H<sub>2</sub>O que los rodean, por lo que éstas tampoco estarán a disposición del microorganismo.

CO<sub>2</sub>: 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 quimioautolitótrofos).
- Las arqueobacterias metanogénicas pueden usar el CO<sub>2</sub> como aceptor de los electrones procedentes de la oxidación del H<sub>2</sub>, proceso por el que obtienen su energía:



- Los heterótrofos, aunque no usan el CO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> puede ser:

- endógeno: procedente de descarboxilaciones que ocurren al degradar la fuente orgánica de carbono
- exógeno: el CO<sub>2</sub> de la atmósfera o disuelto en las soluciones acuosas.

Normalmente, las bacterias crecen a la concentración de CO<sub>2</sub> atmosférico (0.03%), pero algunas bacterias (*Neisseria*, *Brucella*), cuando se aíslan por primera vez, requieren atmósferas enriquecidas con 5-10% de CO<sub>2</sub>. Ello parece deberse a que poseen alguna enzima con baja afinidad hacia el CO<sub>2</sub>. Sin embargo, tras varios subcultivos, suelen adaptarse a crecer a tensiones normales.

Fósforo: Suele requerirse en forma de fosfatos, sea orgánicos o inorgánicos. 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 (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 (ej. el Cl<sup>-</sup>) y de cationes para la célula. Los siguientes cationes, concretamente, se necesitan en cantidades relativamente grandes: K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>.

Potasio (K<sup>+</sup>):

- 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 teicóicos de la pared.

Magnesio (Mg<sup>2+</sup>):

- 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.

#### Calcio ( $Ca^{2+}$ ):

- Es un cofactor de ciertas enzimas, como proteinasas.

#### Hierro:

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 (p.ej., hidroxamatos y enterobactina).

- 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.

Aparte de estos iones que se requieren en cantidades relativamente grandes, las bacterias necesitan minúsculas cantidades de otros elementos (oligoelementos), 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  $H_2$ .

Elemento / nutriente de la Naturaleza		Fuentes/ Reservorio	Importancia para los microorganismos
Carbón	$CO_2$ (gas) $CO_3^{-2}$ Compuestos orgánicos	Aire (0,036%) Sedimentos Seres vivos	$CO_2$ es producido por la respiración y se utiliza en la fotosíntesis; $CO_3^{-2}$ se encuentra en las paredes celulares y esqueletos; compuestos orgánicos son esenciales para la estructura y función de todos los organismos y virus.
Nitrógeno	$N_2$ (gas) $NO_3^-$ $NO_2^-$ $NH_3$ Nitrógeno orgánico (proteínas, ácidos nucleicos)	Aire (79%) Suelo y agua Suelo y agua Suelo y agua Organismos	El gas nitrógeno está disponible sólo para ciertos microbios que lo fijan en otros compuestos de nitrógeno inorgánico -nitratos, nitritos y amonio- las principales fuentes de nitrógeno para las algas, las plantas y la mayoría de las bacterias; animales y protozoos requieren nitrógeno orgánico; todos los organismos pueden usar $NH_3$ para sintetizar aminoácidos y ácidos nucleicos.
Oxígeno	$O_2$ (gas) Óxidos $H_2O$	Aire (20%), un producto principal de la fotosíntesis	Es necesario gas de oxígeno para el metabolismo de nutrientes por aerobios. El oxígeno es un elemento no puede signifi en compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos (véase el agua, sulfatos, fosfatos, nitratos, dióxido de carbono).
Hidrógeno	$H_2$ (gas) $H_2O$ $H_2S$ $CH_4$ Compuestos orgánicos	Agua, pantanos, volcanes, respiraderos Organismos	El agua es el compuesto más abundante en las células y un disolvente para las reacciones metabólicas; $H_2$ , $H_2S$ , $CH_4$ y gases son producidos y utilizados por las bacterias y arqueas; Iones $H^+$ son la base para las transferencias de energía celular y ayudan a mantener el pH de las células.
Fósforo	$PO_4^{-3}$	Rocas, depósitos minerales	Fosfato, un componente clave de ADN y ARN, es crítico para la composición genética de las células y virus; también encontrado en el ATP y NAD, donde participa en

			numerosas reacciones metabólicas; su presencia en fosfolípidos proporciona estabilidad a las membranas celulares.
Azufre	S SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> SH	Los depósitos minerales, sedimentos volcánicos	El azufre elemental es oxidado por algunas bacterias como fuente de energía; El azufre se encuentra en vitamina B1; grupos sulfhidrilo son parte de ciertos aminoácidos, donde forman disulfuro de bonos que forma y estabilizan las proteínas.
Potasio	K <sup>+</sup>	Los depósitos minerales, el agua del océano	Juega un papel en la síntesis de proteínas y el transporte de membrana
Sodio	Na <sup>+</sup>	Los depósitos minerales, el agua del océano	Mayor participante en las acciones de membrana; mantiene la presión osmótica en las células
Calcio	Ca <sup>+</sup>	Sedimentos oceánicos, rocas y minerales	Un componente de conchas de protozoarios (como CaCO <sub>3</sub> ); estabiliza las paredes celulares; agrega resistencia a las endosporas bacterianas
Magnesio	Mg <sup>+2</sup>	Sedimentos geológicos, rocas	Un átomo central en la molécula de clorofila; requerida para la función de las membranas, los ribosomas, y algunas enzimas
Cloro	Cl <sup>-</sup>	Océano de agua, lagos de sal	Puede funcionar en el transporte de membrana; requerido por halófilos obligados a regular la presión osmótica
Hierro	Fe <sup>+2</sup>	Rocas, minerales	Elemento esencial para la estructura de las proteínas respiratorias (citocromos o centros Fe-S)
Zinc	Zn <sup>+2</sup>	Rocas, minerales	Un cofactor de enzimas o metaloenzimas
Micro-nutrientes	Cu, Co, Ni, Mn, Mo, I <sub>2</sub>	Sedimentos geológicos	Requerido en pequeñas cantidades para servir como cofactores en sistemas de enzimas especializadas de algunos microbios

### Nutrientes particulares

Se trata de elementos que pueden ser cubiertos de modo muy distinto, dependiendo del tipo de bacteria que consideremos. Concretamente, los elementos N y S (que requieren todos los seres vivos) pueden ser captados por las bacterias de modos muy distintos, dependiendo de sus capacidades metabólicas.

Tanto el N como el S se encuentran en la célula en estado reducido:

- El radical -NH<sub>2</sub> forma parte de los aminoácidos de las proteínas y de las bases nitrogenadas que participan en los ácidos nucleicos y en algunas coenzimas.
- El radical -SH interviene en determinados aminoácidos y en coenzimas como la Coenzima A.

En qué formas químicas entran N y S a las bacterias?

La mayoría de las bacterias fotosintéticas y muchas heterótrofas asimilan estos elementos en forma combinada inorgánica oxidada:

- NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: merced a la actuación secuencial de nitrato-reductasas y nitrito-reductasas asimilatorias.
- SO<sub>4</sub><sup>=</sup>: Este sulfato se activa con ATP, y luego se reduce hasta sulfito y finalmente sulfhídrico, que ya tiene el estado de reducción adecuado para la incorporación del S.

Muchas bacterias heterótrofas pueden usar alguna forma reducida:

- N inorgánico: amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)
- S inorgánico: sulfuros (S<sup>=</sup>, SH<sup>-</sup>)
- N orgánico: aminoácidos, péptidos
- S orgánico: cisteína.

Muchas de las bacterias que pueden usar amonio como única fuente de nitrógeno también pueden usar nitratos.

### Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son moléculas orgánicas específicas que algunas bacterias necesitan para crecer pero en muy pequeña cantidad. Salvo excepciones no tienen función plástica (no forman

parte 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
Acido fólico	Metabolismo de compuestos C1, transferencia de grupos metilo.
Biotina	Biosíntesis de ácidos grasos; fijación de CO <sub>2</sub>
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, menaquinonas, etc.)

### Auxotrofia

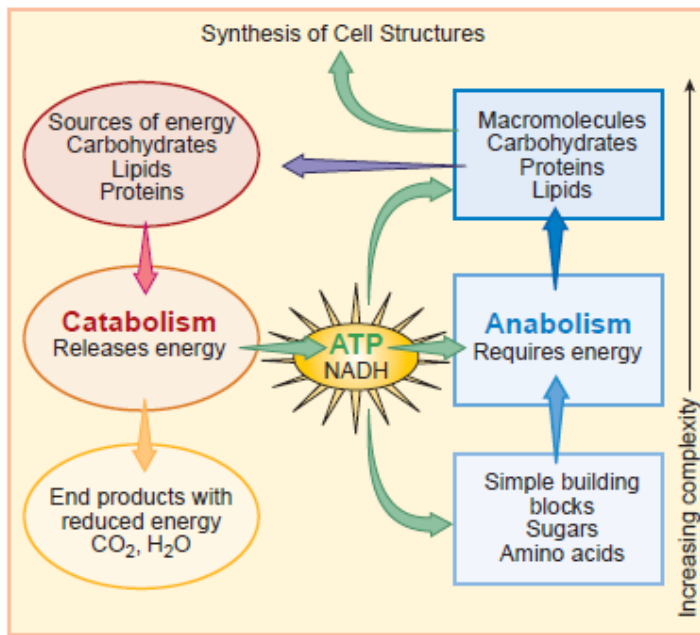
Se dice que un microorganismo es auxótrofo cuando sólo es capaz de proliferar en un medio de cultivo si a éste se le ha añadido alguna sustancia específica (ej. un factor de crecimiento o aminoácido), que el tipo silvestre o parental, llamado protótrofo, no requiere porque es capaz de sintetizarla. Una auxotrofia se produce por una mutación que genera la carencia de una ruta metabólica funcional involucrada en la síntesis de la sustancia de la que depende el auxótrofo.

### Metabolismo bacteriano

En la naturaleza los microorganismos se encuentran formando comunidades y compartiendo diversos nichos ecológicos. Esto determina que los distintos grupos microbianos desarrollarán capacidades para metabolizar la diversa variedad de sustancias presentes en cada medio. La palabra metabolismo proviene del término griego “metabole”, que significa cambio, más el sufijo “-ismo”, que significa cualidad, sistema, o sea la cualidad que tienen los seres vivos de cambiar químicamente la naturaleza de ciertas sustancias. Aunque el metabolismo implica miles de diferentes reacciones, la mayoría de ellos se pueden colocar en una de dos categorías generales: catabolismo o anabolismo. En el caso de catabolismo, las moléculas más grandes se degradan o descomponen en moléculas más pequeñas, por lo general con la liberación de energía. En el caso de anabolismo, también llamada la biosíntesis, moléculas más grandes se construyen a partir los más pequeños, lo que resulta en la formación de estructuras celulares. Por lo general, el anabolismo es impulsado por la energía y poder reductor que deriva del catabolismo. A pesar de que tienen efectos opuestos, el anabolismo y catabolismo están estrechamente vinculadas y son altamente complementarias para llevar a cabo las funciones esenciales para la vida.

Estas transformaciones son necesarias para la supervivencia y la función celular, y son la base del metabolismo bacteriano; como resultado de estos procesos metabólicos, algunos productos formados son excretados hacia el medio ambiente. Ensayos sobre estos productos finales pueden servir para identificar, clasificar y separar los microorganismos.

## Búsqueda y utilización de la energía

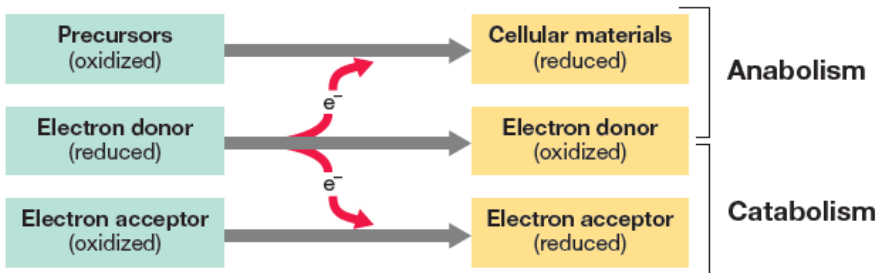


A excepción de ciertas bacterias quimioautotróficas, la principal fuente de energía es el sol pero sólo los autótrofos fotosintéticos pueden aprovechar esta fuente directamente. Esta capacidad de convertir la energía solar en energía química (fotosíntesis) proporciona una base energética y nutricional para los otros seres vivos heterótrofos. Los microorganismos heterótrofos extraen la energía química presente en los nutrientes y utilizan esa energía hacia el trabajo útil de la célula.

La base para la energética celular radica en los enlaces químicos, transferencias electrónicas, y vías

especiales y sus enzimas. Durante las reacciones exergónicas, los electrones son sacados de los átomos, que libera su energía inherente. La energía obtenida se transfiere a moléculas especializadas, principalmente ATP. Así el ATP formado liberará inmediatamente su energía para apoyar las reacciones endergónicas tales como la síntesis de biomoléculas. Estas reacciones están en equilibrio cíclico, por lo que el ATP constantemente se está sintetizando y utilizando, y así sucesivamente.

## Estrategias energéticas en microorganismos



El metabolismo de nutrientes es muy variado, sobre todo en las bacterias, sin embargo, en muchos casos, se basa en vías catabólicas básicas: glicólisis via las rutas de Embden-Meyerhoff-

Parnas (EMP), Entner Doudoroff (ED) o la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, ciclo de Krebs y cadenas respiratorias. Estas vías proveen los precursores necesarios para otras vías metabólicas. Los microorganismos pueden dependiendo de su relación con el oxígeno realizar distintos procesos para obtener energía. El oxígeno en las células proviene principalmente de compuestos orgánicos, agua o CO<sub>2</sub>. El oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) se utiliza raramente en procesos biosintéticos. Algunos procariontes usan O<sub>2</sub> como aceptor de electrones, pero algunos no pueden utilizarlo. Por lo tanto, los organismos pueden agruparse de acuerdo con su reacción con O<sub>2</sub> en aerobios que requieren O<sub>2</sub>, anaerobios facultativos que usan O<sub>2</sub> cuando está disponible pero también pueden crecer en su ausencia, y anaerobios que no usan O<sub>2</sub>. Algunos anaerobios no pueden crecer y/o perder su viabilidad en presencia de O<sub>2</sub> mientras otros pueden tolerarlo. Los primeros se denominan anaerobios estrictos y los últimos aerotolerantes.

La respiración aeróbica es característica de muchas bacterias, hongos, protozoos, y animales. Consiste en una serie de reacciones que oxidan la fuente de carbono a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O con la producción de energía (en forma de ATP y compuestos fosforilados de alta energía de hidrólisis) así como de

poder reductor. El oxidante es el oxígeno libre que actúa como aceptor final de electrones. En este proceso se utiliza principalmente la glucólisis, el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. En ausencia de oxígeno, algunas bacterias pueden reducir otros aceptores de electrones como el nitrato en un proceso denominado respiración anaeróbica.

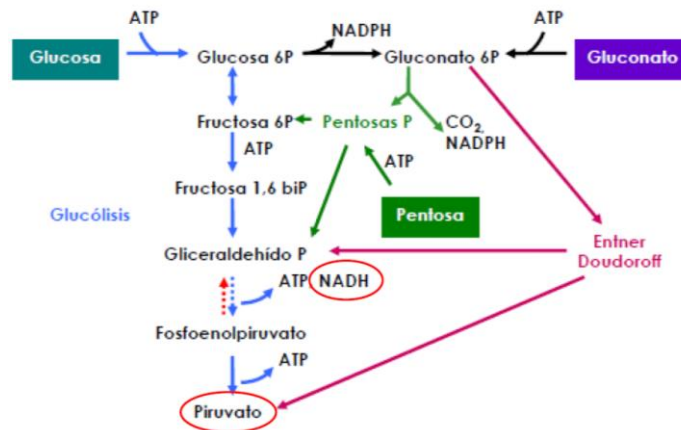
Los anaerobios facultativos y aerotolerantes poseen generalmente un metabolismo fermentativo a partir de hidratos de carbono con producción de productos de fermentación en el medio y menor producción de ATP respecto al metabolismo respiratorio.

Scheme	Pathways Involved	Final Electron Acceptor	Products	Primary Pathway Found In
Aerobic respiration	Glycolysis, Krebs cycle, electron transport	O <sub>2</sub>	ATP, CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O	Aerobes; facultative anaerobes
Anaerobic metabolism				
Fermentative	Glycolysis	Organic molecules	ATP, CO <sub>2</sub> , ethanol, lactic acid*	Facultative, aerotolerant, strict anaerobes
Respiration	Glycolysis, Krebs cycle, electron transport	Various inorganic ions (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>3-</sup> )	CO <sub>2</sub> , ATP, organic acids, H <sub>2</sub> S, CH <sub>4</sub> , N <sub>2</sub>	Anaerobes; some facultatives

### Degradación de la glucosa:

La vía principal de degradación de la glucosa en microbios se conoce como glicólisis, termino generalmente asociado a la ruta EMP si bien hay varias alternativas en procariontas. La ruta EMP consiste en 10 reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato, dos de NADH y dos de ATP. Rutas glicolíticas alternativas para la degradación de la glucosa a piruvato de amplia presencia en procariontas son:

- Vía de las Pentosas Fosfato o del fosfogluconato. Si bien en determinados grupos de procariontas es la vía más importante para la obtención de energía, en la mayoría de las bacterias es utilizada para la obtención de NAD (P)H y de ribosa-5-P para la biosíntesis de nucleótidos.
- Vía de Entner-Doudoroff (ED): Esta vía glicolítica alternativa presente solo en procariontas posee como metabolito intermediario al 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato (ausente en la ruta EMP y en la ruta de las pentosas fosfato) lo cual permite su identificación.



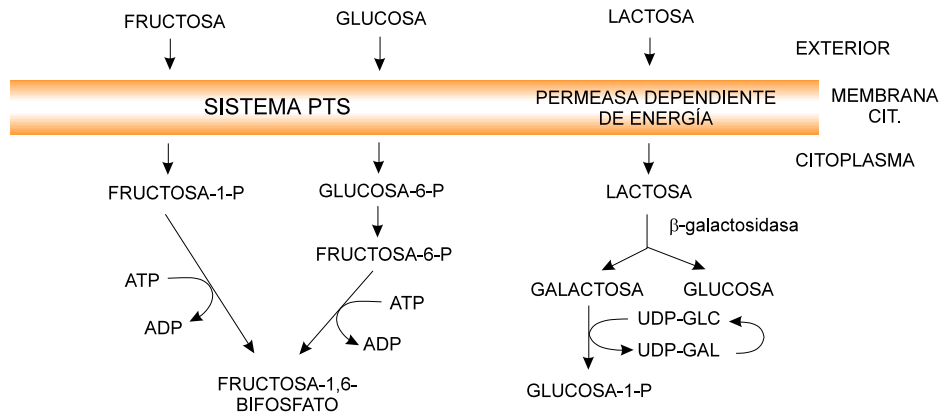
### Resumen de vías glicolíticas principales presentes en procariontas.

#### Crecimiento en otros sustratos distintos de la glucosa

Para poder metabolizar otras fuentes de carbono se necesita un cambio en los niveles de distintas enzimas de la célula:

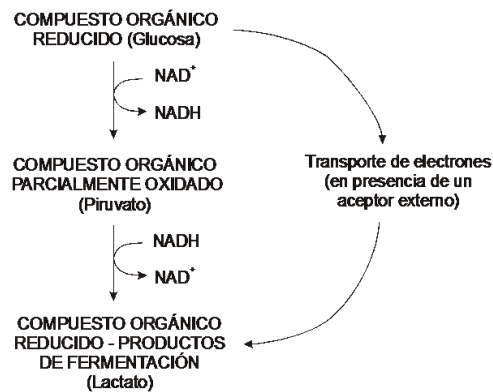
- Síntesis de enzimas catabólicas y sistema de transporte apropiados
- Formación de las vías anapleróticas apropiadas

#### Utilización de Glucosa, Fructosa y Lactosa en Enterobacterias:

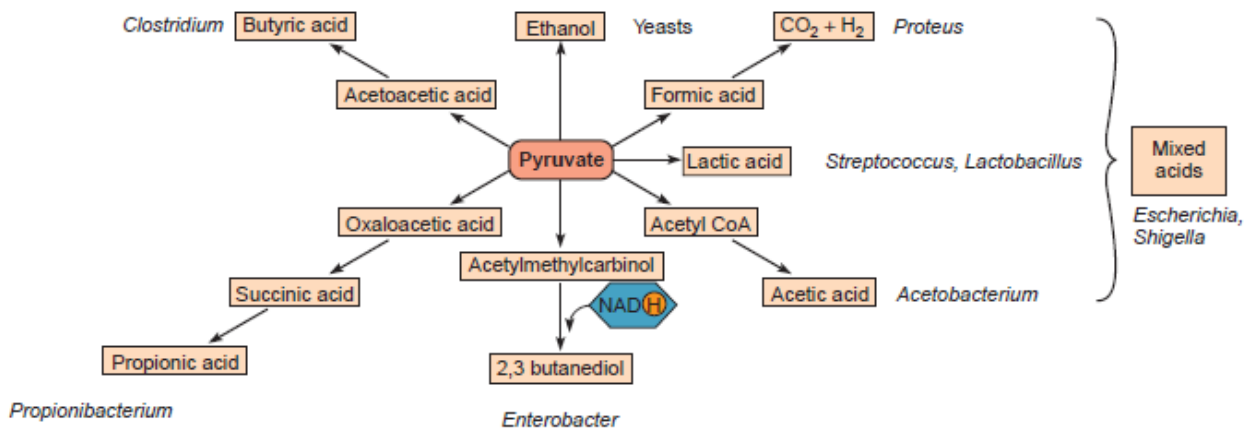


## Fermentación

En ausencia de un aceptor externo de electrones, muchos organismos llevan a cabo reacciones de óxido-reducción internas de los compuestos orgánicos con liberación de energía. Este proceso se denomina fermentación, y es un proceso metabólico redox generador de ATP en el que los compuestos orgánicos sirven tanto de dadores de electrones (oxidándose) como de aceptores de electrones. El ATP es producido en un proceso denominado fosforilación a nivel de sustrato, en pasos enzimáticos específicos en el catabolismo del compuesto orgánico.



Una gran variedad de azúcares y compuestos orgánicos pueden ser fermentados por las bacterias, produciendo diversos productos finales:



## Respiración

Se puede definir como un proceso metabólico generador de ATP, en el que tanto compuestos orgánicos como inorgánicos sirven como dadores de electrones que acceden a una cadena

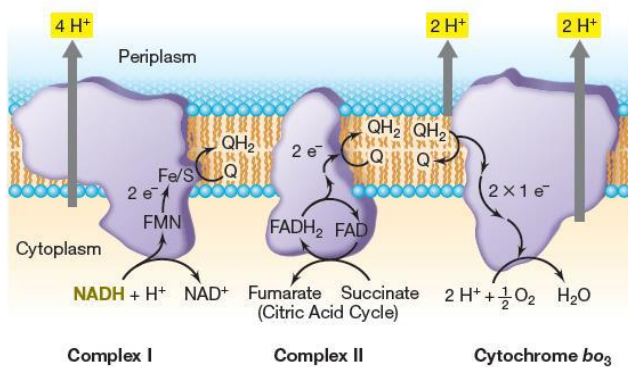
respiratoria y que finaliza en un aceptor externo de electrones el cual es reducido. Si el aceptor final de electrones es el  $O_2$  molecular, la respiración se denomina aeróbica. Si este es distinto del oxígeno molecular, el proceso se llama respiración anaeróbica. Existen bacterias que pueden utilizar  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $SO_4^{2+}$ , etc. como aceptores finales en una cadena de transportadores de electrones que poseen las reductasas específicas correspondientes.

### Sistemas de transporte de electrones

Dichos sistemas están compuestos por complejos asociados a la membrana plasmática de la bacteria, y poseen como funciones:

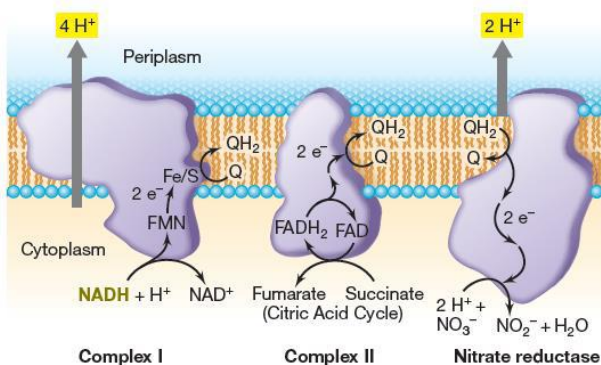
- Aceptar electrones de un metabolito reducido generado durante el metabolismo (regenerando así el correspondiente sustrato oxidado) y transferir los mismos a un aceptor presente en la membrana.
- Conservar la energía liberada durante el proceso de transferencia de electrones en forma de un gradiente electroquímico, el cual será utilizado mediante una ATPasa que bombea protones para la síntesis de ATP en un proceso denominado fosforilación oxidativa.

#### a) Respiración aeróbica en bacterias

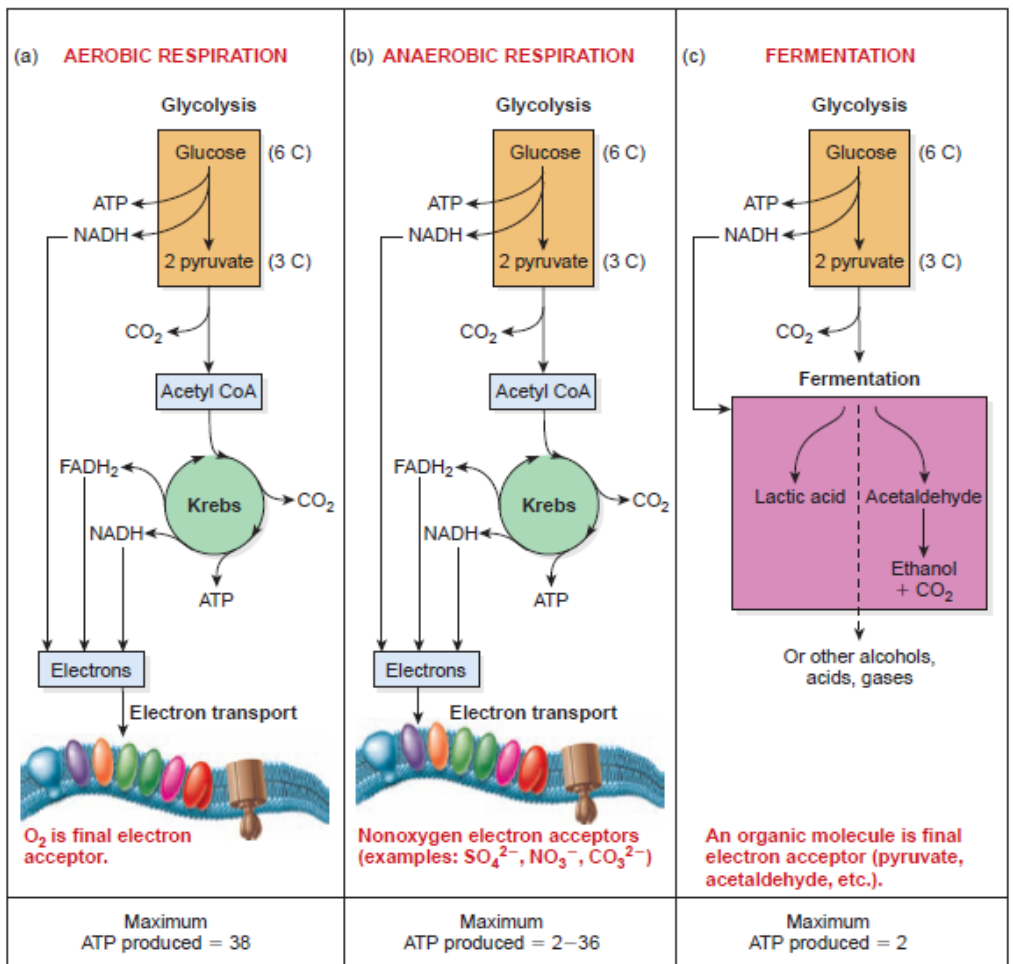


Los citocromos *b* y *o* forman parte del complejo de la quinol-oxidasa localizado en la membrana plasmática y responsable de la re-oxidación del quinol generado durante el transporte de electrones.

#### b) Respiración anaeróbica en bacterias utilizando $NO_3^-$ como aceptor final de electrones:



El citocromo *b* forma parte del complejo de la nitrato reductasa localizado en la membrana plasmática responsable de la re-oxidación del quinol generado durante el transporte de electrones.



## Capítulo II.B

### Microorganismos en la naturaleza y biotecnología

El estudio de los microbios en sus hábitats naturales se conoce como ecología microbiana y el estudio de los usos prácticos de los microbios en la elaboración de alimentos, la producción industrial, y la biotecnología se conoce como la microbiología industrial o aplicada. Existe una tendencia generalizada a caracterizar negativamente a los microbios, asociándolos a enfermedades y procesos destructivos o de putrefacción. Sin embargo, lejos de tener sólo una faceta aparentemente en detrimento de las actividades humanas, los microorganismos cumplen una función fundamental para el mantenimiento de la vida en la tierra tal como la conocemos. Así, los microorganismos representan para el ser humano la cara y la cruz de una misma moneda. Veamos unos cuantos ejemplos.

- Todos los ecosistemas terrestres dependen de los microorganismos.
- Muchos microorganismos contribuyen significativamente a la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis oxigénica.
- Algunos microorganismos constituyen flora normal en seres humanos (microbiota), animales e insectos, y son indispensables para mantener su salud interviniendo, por ejemplo, en la absorción de nutrientes y compitiendo con bacterias patogénicas.
- Numerosos microorganismos intervienen en la producción de alimentos y productos químicos y farmacéuticos (biotecnología). Usando tecnologías de ADN recombinante se ha podido expandir la capacidad de bacterias y hongos para producir sustancias de interés industrial como antibióticos, vacunas, y enzimas.
- Los microorganismos degradan las plantas y animales muertos y reciclan elementos químicos para ser nuevamente utilizados por plantas y animales vivos.
- Se usan bacterias para descomponer materia orgánica en aguas de alcantarillado.
- Los procesos de Biorremediación utilizan bacterias que metabolizan desechos tóxicos.
- En terapia genética, se usan virus para sustituir genes defectuosos o perdidos en las células humanas.
- En agricultura se usan bacterias para mejorar la captación de  $N_2$  de las plantas, para mejorar las condiciones de almacenamiento de los granos, para proteger las plantas de la escarcha y los insectos.

#### Microbiología del suelo

El suelo contiene una gran población de microorganismos, (bacterias, hongos, algas y protozoos), cuyas actividades tienen una gran importancia en la fertilidad del suelo. Intervienen en los ciclos de la materia ( $N_2$ , C, S, P), mineralizando la materia orgánica convirtiéndola en nutrientes asimilables por las plantas y transformando compuestos de importancia geológica (carbón, petróleo, azufre) y ambientales.

Existen del orden de varios miles de millones de bacterias por gramo de suelo. La mayor parte son heterótrofos, siendo comunes los bacilos esporulados, los actinomicetos que son los responsables del olor a tierra mojada (geosmina), y en la rizosfera (región donde el suelo y las raíces de las plantas entran en contacto) especies de los géneros *Rhizobium* y *Pseudomonas*.

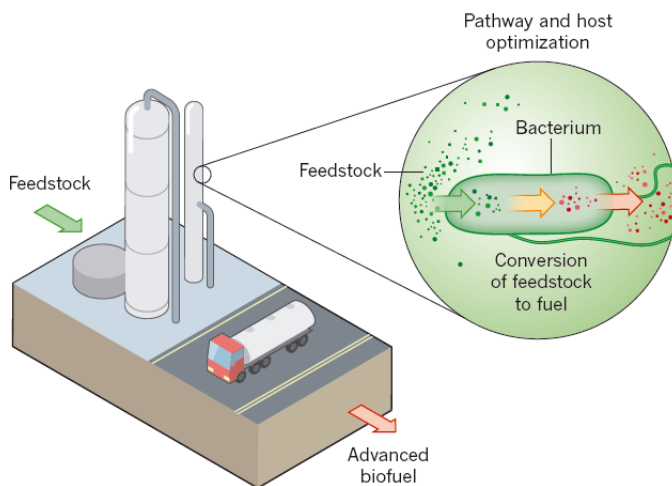
El número y tipo de microorganismos presentes en el suelo depende de diversos factores ambientales con enorme variabilidad, como son los nutrientes, humedad, aireación, temperatura, pH, prácticas agrícolas, etc. Por esta razón la mayoría de los microorganismos encontrados en el suelo tienen algún mecanismo para sobrevivir en períodos desfavorables. Algunos de esos mecanismos son la formación de esporas, enquistamiento y producción de cápsulas protectoras. Otros microorganismos del suelo cuentan con rutas metabólicas que les permiten competir efectivamente con otros por los nutrientes, o producen sustancias tóxicas o antibióticos que actúan sobre sus competidores. Muchas bacterias del suelo pueden fijar  $N_2$  y convertirlo en  $NH_3$  en un

proceso denominado fijación de nitrógeno; otras pueden crecer usando sustratos orgánicos inusuales como fuente de carbono, que les permiten crecer cuando los sustratos comunes están ausentes.

A pesar de que el estudio de los microorganismos del suelo y su fisiología es una tarea compleja, actualmente se disponen de diversas técnicas básicas que nos permiten conocer la biodiversidad de este hábitat y determinar las actividades metabólicas que intervienen en los ciclos del carbono y el nitrógeno.

### Aplicaciones industriales

La utilización de microorganismos para la producción de compuestos de interés comercial o ambiental es una de las ramas más importantes de la Biotecnología. También denominada microbiología industrial, esta disciplina abarca procesos tan diversos como la producción de: alimentos (pan, bebidas fermentadas, productos lácteos) y suplementos dietéticos (extractos de algas o levaduras, vitaminas o aminoácidos), biopolímeros (xantano, alginato, celulosa, ácido hialurónico, polihidroxialcanoatos), compuestos de interés médico o farmacéutico (antibióticos, hormonas, esteroides), solventes, ácidos orgánicos, biocombustibles, enzimas, etc.

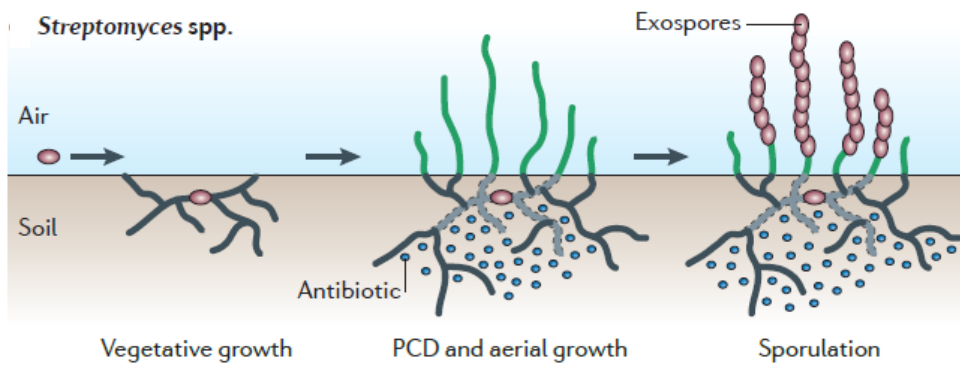


La biotecnología tradicional es tan antigua como la manipulación de alimentos fermentados como el vino, pan o yogur. La era de la biotecnología se ha desarrollado rápidamente en las últimas décadas, y se ha caracterizado por la modificación de los microorganismos mediante el uso de la biología molecular, fundamentalmente mediante tecnologías de ADN recombinante. De este modo es posible manipular la información genética para producir enzimas modificadas, metabolitos nuevos o provenientes de un organismo diferente (expresión heteróloga), etc.

La selección y el uso de microorganismos en la microbiología industrial presentan numerosos desafíos técnicos que requieren una sólida comprensión de la biología del microorganismo, como así también de sus interacciones con otros organismos. Utilizar microorganismos para fines biotecnológicos requiere primero identificar o crear el microorganismo que lleva a cabo el proceso deseado de la forma más eficiente. Este microorganismo será posteriormente utilizado, ya sea en un ambiente controlado (fermentador) o en sistemas complejos como suelos o aguas, para alcanzar la producción del compuesto deseado.

### Producción de Antibióticos

Las bacterias del género *Streptomyces* pertenecen al grupo actinomycetes, que incluye géneros como *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Saccharopolyspora* y *Thermomonospora*. Miembros del género *Streptomyces* son bacterias Gram-positivas con alto contenido de G+C en su ADN. Estas bacterias son normalmente aisladas del suelo o de sedimentos marinos; de donde obtienen sus nutrientes y energía degradando material orgánico insoluble gracias a la producción de una gran variedad de enzimas hidrolíticas extracelulares, como por ejemplo celulasas, xilanasas, amilasas, maltasas, etc. Ya que pueden descomponer complejas mezclas de polímeros en plantas muertas, animales y hongos, juegan un papel importante en la biodegradación del suelo reciclando nutrientes.



La habilidad para colonizar el suelo de los miembros del género *Streptomyces* está favorecida por el crecimiento de una masa de hifas vegetativas en forma de micelio, el cual sufre un complejo

proceso de diferenciación morfológica que lleva a la formación de cadenas de exoesporas uninucleadas. La generación de estas esporas provee un mecanismo para la dispersión y colonización de nuevos medio ambientes.

Otra característica importante del género *Streptomyces* y que ha generado gran interés tanto académico como industrial, es su habilidad para producir una asombrosa variedad de metabolitos secundarios. Estos son compuestos con un amplio rango de estructuras químicas y actividades biológicas, los cuales juegan un papel importante en la supervivencia y diferenciación de estos microorganismos, pero no son esenciales para su crecimiento. El principal papel de los antibióticos es defender la colonia de competidores en el momento que se desarrolla el micelio aéreo que es el estado susceptible a lisis de la masa de hifas vegetativas. Los metabolitos secundarios poseen una gran variedad de actividades biológicas como ser: antibacterianos (tetraciclinas y eritromicinas), antifúngicos (anfotericinas, griseofulvina), anticancerígenos (doxorubicina, enedines), antiparasitarios (avermectina, nemadectina), cardiovasculares (lovastatin, compactin), inmunosupresores (FK506, rapamicina) y como agentes veterinarios (tilosina, monensina). Dos tercios de todos los compuestos conocidos son producidos por miembros del grupo actinomycetes. De los compuestos producidos por actinomycetes, 80 % son producidos por bacterias del género *Streptomyces*. Alrededor del 80% de los aislamientos del suelo pertenecen al género *Streptomyces*; se encuentran en concentraciones viables de  $10^6$ - $10^7$  por gramo de tierra. Diversas especies de *Streptomyces* producen geosminas responsables del olor característico de la tierra fértil. Su aislamiento es relativamente sencillo pues son nutricionalmente muy versátiles: utilizan almidón, asparagina o malato cálcico como fuente de carbono y caseína no digerida o nitrato potásico como fuente de nitrógeno.

### Producción de Exoenzimas

Las enzimas se producen comercialmente desde fines del siglo pasado y a partir de la década de 1960 comienza la producción masiva con microorganismos. Los microorganismos ofrecen grandes ventajas como sistemas de producción de enzimas, dada su alta velocidad de síntesis, alto rendimiento de conversión de sustrato en proteína enzimática, gran versatilidad y mayor simplicidad en la manipulación ambiental y genética de su capacidad productiva. Las enzimas de uso industrial, son mayoritariamente hidrolasas extracelulares de estructura simple, estables y sin requerimientos de cofactores dissociables para su actividad. Estas enzimas son producidas por las bacterias como respuestas adaptativas de fase estacionaria que le sirven para la provisión de nutrientes en condiciones de hambre extremo como lo es la situación en su hábitat natural.

Mientras que para las bacterias Gram positivas la exportación al extracelular esta facilitada por carecer de membrana externa, las Gram negativas presentan complejos sistemas de secreción para atravesar la capa externa de LPS. Además, existen diferentes niveles de control genético de la expresión de estas actividades, que han sido ampliamente estudiados. Uno de los problemas de las enzimas es su inestabilidad, siendo particularmente sensibles a la temperatura; de manera que la vida media puede llegar a ser muy corta o su actividad baja en temperaturas ambiente.

En la siguiente tabla se muestran algunas enzimas de origen microbiano y su campo de aplicación industrial:

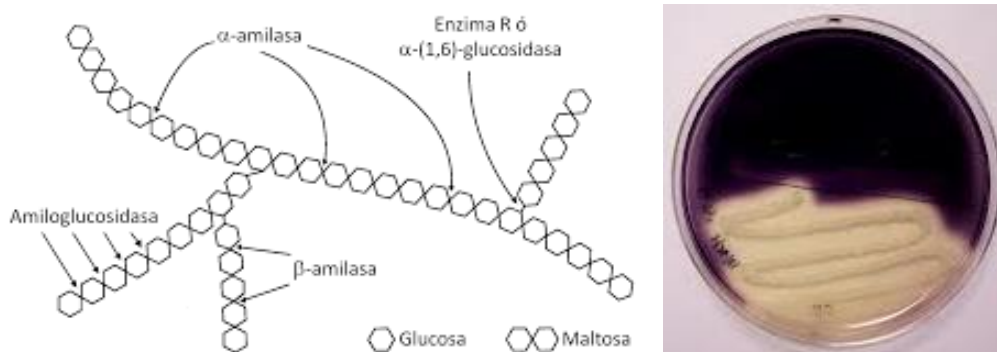
<b>Industria</b>	<b>Clase de enzima</b>	<b>Aplicación</b>
Detergentes	Proteasa	Remoción de manchas proteicas
	Amilasa	Remoción de manchas de almidón
	Lipasa	Remoción de manchas de grasa
	Celulasa	Limpieza, aclarado y anti-redeposición (algodón)
	Mananasa	Remoción de manchas de manano
Almidón y combustibles	Amilasa	Licuefacción y sacarificación de almidón
	Amiloglucosidasa	Sacarificación
	Pululanasa	Sacarificación
	Glucosa isomerasa	Conversión de glucosa a fructosa
	Ciclodextrina glicosiltransferasa	Producción de ciclodextrina
	Xilanasa	Reducción de viscosidad
	Proteasa	Sustratos para levaduras
Alimentos	Proteasa	Coagulado de leche, saborizantes
	Lipasa	Sabor en los quesos
	Lactasa	Remoción de lactosa
	Pectin metilesterasa	Solidificación de productos derivados de frutas
	Pectinasa	Productos derivados de frutas
	Transglutaminasa	Modificación de propiedades viscoelásticas
Panificaciones	Amilasa	Volumen y blandura del pan
	Xilanasa	Acondicionado de la masa
	Lipasa	Acondicionado y estabilizado de la masa (emulsificador)
	Fosfolipasa	Acondicionado y estabilizado de la masa (emulsificador)
	Glucosa oxidasa	Fortalecimiento de la masa
	Lipoxigenasa	Fortalecimiento de la masa y blanqueado del pan
	Proteasa	Bizcochos, galletitas
	Transglutaminasa	Fortalecimiento de masas laminadas
Alimentación animal	Fitasa	Digestibilidad de fitatos-liberación de fósforo
	Xilanasa	Digestibilidad
	α-Glucanasa	Digestibilidad
Bebidas	Pectinasa	Depectinización, macerado
	Amilasa	Tratamiento de jugos, cerveza light
	α-Glucanasa	Macerado
	Acetolactato decarboxilasa	Maduración (cerveza)
	Laccasa	Clarificaro (jugos), sabor (cerveza) tratamiento de corchos
Textil	Celulasa	Terminación de jeans, ablandado de algodón
	Amilasa	Achicado
	Pectato liasa	Desgastado
	Catalasa	Terminación del blanqueado
	Laccasa	Blanqueado
	Peroxidasa	Remoción de excesos de tintura
Pulpa y papel	Lipasa	Control de desechos y contaminantes
	Proteasa	Remoción de biofilm
	Amilasa	Almidonado, desteñido, mejora de drenado
	Xilanasa	Blanqueado
	Celulasa	Desteñido, mejora de drenado, modificación de fibras
Grasas y aceites	Lipasa	Transesterificación

	Fosfolipasa	Desgomado, producción de lisolectina
Síntesis orgánica	Lipasa	Resolución de alcoholes quirales y amidas
	Acilasa	Síntesis de penicilina semisintética
	Nitrilasa	Síntesis de ácidos carboxílicos enantiopuros
Cueros	Proteasa	Remoción de pelo
	Lipasa	Curtido

### Amilasas

La capacidad de un microorganismo de hidrolizar el almidón está asociada a la enzima  $\alpha$ -amilasa extracelular. Esta propiedad suele ser utilizada como criterio de identificación de aislamientos desconocidos. Los polímeros de este tipo no pueden atravesar las membranas como tales, por lo cual las bacterias secretan enzimas (en la mayoría de los casos son hidrolasas) que degradan los polímeros a pequeñas moléculas transportables.

Un test cualitativo para determinar la presencia de almidón es la aparición de un color azul luego de la adición de una solución de yoduro de potasio /  $I_2$  (Lugol). Luego de su hidrólisis, los productos de clivaje del almidón (dextrinas, maltosa y glucosa) no se tiñen con este colorante. Este principio será utilizado para testear la hidrólisis del almidón en el TP4.

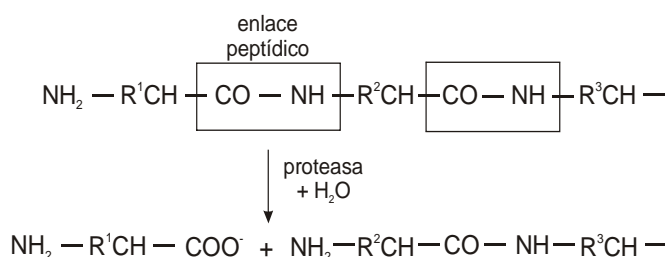


Algunos productores de  $\alpha$ -amilasa son bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas*. Éstos degradan el almidón primero en polisacáridos más cortos (dextrinas) y subsecuentemente en maltosa, glucosa y oligosacáridos con unión  $\beta$ -1,6.

### Proteasas

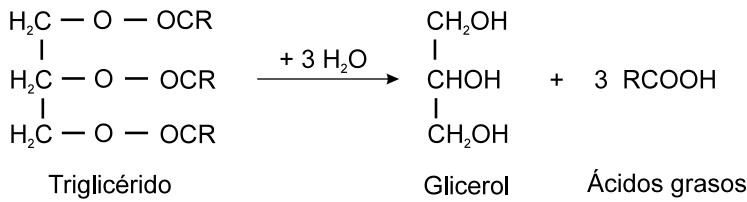
Muchas bacterias pueden degradar diversas proteínas y utilizar los péptidos y aminoácidos resultantes como fuente de energía y para sintetizar sus propias proteínas.

Un ejemplo es la hidrólisis de la caseína. La caseína existe en la leche como una suspensión coloidal que da a la leche su aspecto opaco. Muchas bacterias producen enzimas que hidrolizan esta proteína dando derivados solubles y transparentes. La ruptura de proteínas, a veces llamada **peptonización**, es útil en la identificación de especies microbianas.



Lipasas

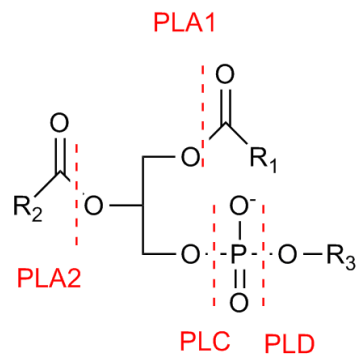
La degradación de lípidos es llevada a cabo por enzimas extracelulares llamadas lipasas (esterasas), que rompen la unión éster por adición de H<sub>2</sub>O, liberando glicerol y ácidos grasos.



Una vez asimilados dentro de la célula, estos ácidos grasos pueden ser metabolizados por el proceso de β-oxidación, que resulta en la liberación de Acetil CoA, más un ácido graso con dos átomos de C menos. Este Acetil CoA es posteriormente oxidado a CO<sub>2</sub> por el Ciclo de Krebs, o es convertido a hexosas y otros componentes celulares a través del Ciclo del Glioxilato.

Un método simple para la detección de lipasas es mediante la utilización del medio Agar Trioleína, donde la lipólisis se evidencia por la formación de un halo claro alrededor de la colonia productora de lipasas, contrastada en este medio opaco.

La importancia de la detección de lipasas microbianas es que éstas constituyen el mayor grupo de enzimas de uso industrial. Sus aplicaciones abarcan un enorme espectro de industrias, que incluyen los detergentes, alimentos, químicos, perfumes, cosméticos, biorremediación, etc. Las fosfolipasas son una subclase de lipasas, capaces de hidrolizar fosfolípidos. Se clasifican en cuatro clases principales, denominadas A, B, C y D, según el tipo de reacción que catalicen.



Las fosfolipasas A pueden subdividirse en A1 y A2 según la posición del ácido graso que hidrolizan. Las fosfolipasas B catalizan las actividades A1 y A2.

La yema de huevo presenta una abundante cantidad del fosfolípido lecitina. El clivaje de las uniones fosfoéster por acción de la Fosfolipasa C forma un diglicérido insoluble en agua. Esta actividad enzimática puede ser detectada por una zona de opalescencia en el medio alrededor de la masa celular. Otra posible acción enzimática es la de la Fosfolipasa A, dando un producto soluble en agua (lisolecitina), que en cambio se observa como una zona transparente alrededor de la masa celular. Los fosfolípidos son componentes mayoritarios y funcionales de las membranas celulares. La capacidad de hidrólisis de fosfolípidos de células huéspedes es un factor importante de virulencia de las bacterias que la poseen y por lo tanto su determinación es una herramienta utilizada para caracterizar e identificar miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Clostridium*.

Las fosfolipasas son actualmente utilizadas a nivel industrial en un proceso de refinamiento del aceite denominado “desgomado”, donde remueven los fosfolípidos provenientes del aceite crudo. Tradicionalmente el desgomado se realiza mediante un proceso químico (existen varias alternativas: ácido, alcalino, seco), pero desde hace unos diez años se comenzó a implementar una alternativa enzimática. Actualmente las enzimas más utilizadas son la Purifine® (Verenium, una PLC aislada por metagenómica a partir de una muestra de suelo, expresada heterológamente en *Pichia pastoris*) y

Lecitase® (Novozymes, una PLA1 proveniente de *Fusarium venenatum*, y expresada heterológamente en *Aspergillus oryzae*).

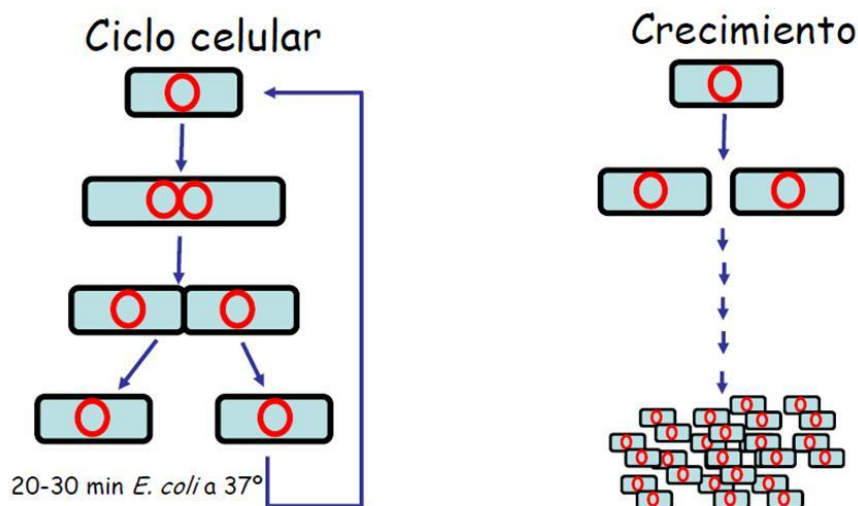


## Capítulo III

### Crecimiento microbiano

El cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse y crecer de forma controlada. El crecimiento de la bacteria conlleva que cada célula u organismo aumenta su tamaño, duplica su cromosoma, y forma un tabique transversal central que divide la célula en dos células hijas nuevas mediante fisión binaria o bipartición completando su ciclo celular. Este proceso se repite a su vez con cada célula hija nueva o sea que, con cada ronda sucesiva de división, la población aumenta. A los fines prácticos definimos como crecimiento microbiano al aumento del número de microorganismos o biomasa a lo largo del tiempo.

En el laboratorio acostumbramos a usar cultivos asincrónicos de microorganismos, puesto que en ellos cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular. Por consiguiente, en un momento determinado en un cultivo se encuentran células que acaban de dividirse, otras que están replicando su ADN, otras que están creciendo, otras que están iniciando la división celular, etc.



#### Crecimiento individual o ciclo celular

Replicación y segregación de cromosomas  
Síntesis de nuevos materiales de las envueltas. Coordinación de la replicación y la división celular

#### Crecimiento poblacional

El crecimiento microbiano es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo

Además, por lo general se trabaja con cultivos puros o axénicos que contienen sólo un tipo de microorganismos. Los cultivos puros se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos del mismo tengan la misma composición genética. Los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de un microorganismo y poder identificarlos con seguridad. Sin embargo, la fisiología de los microorganismos en ambientes naturales puede ser muy diferente a la que solemos usar en el laboratorio para los cultivos puros. Por esto que en la actualidad hay una nueva corriente para el estudio sobre el funcionamiento de las comunidades bacterianas bajo condiciones más acordes a los nichos naturales de los microorganismos.

## Fases del crecimiento bacteriano

Si la bacteria se crece en un medio líquido en la mayoría de los casos las células que se generan luego de cada división continúan su vida independientemente formándose una suspensión de células libres. En un cultivo discontinuo de bacterias en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano:

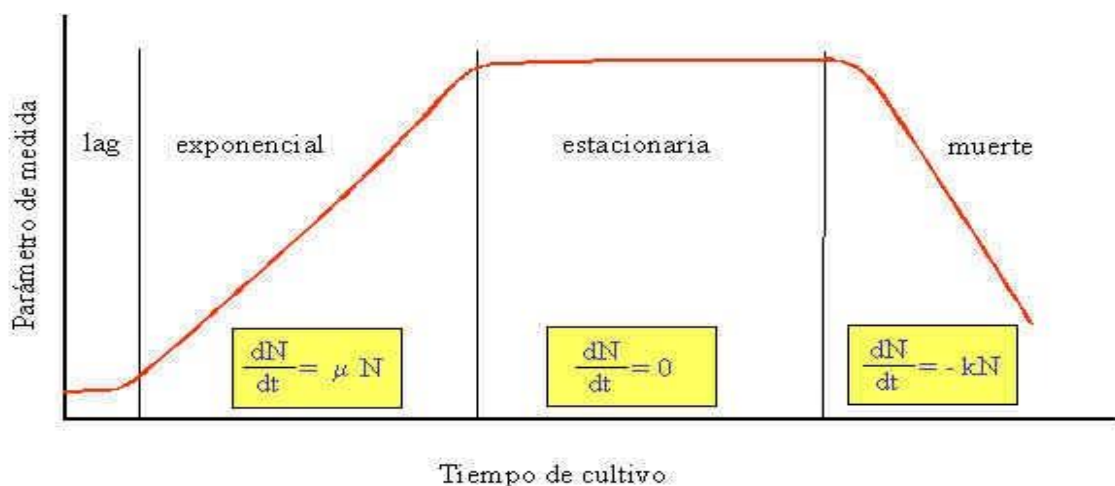
1.- Fase lag o de adaptación durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las condiciones ambientales dependiendo de los nutrientes presentes y su abundancia (fuentes de carbono o nitrógeno, etc.) y condiciones de cultivo (temperatura, O<sub>2</sub>, etc.) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.

2.- Fase exponencial o logarítmica durante la cual las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio y el crecimiento es equilibrado. La evolución del número de células durante esta fase se explica con los modelos matemáticos que describiremos a continuación. En esta fase la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Esta fase continuará siempre y cuando las células tienen nutrientes adecuados y el entorno es favorable.

3.- Fase estacionaria donde no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial, donde la bacteria se prepara a períodos de hambre y estrés y donde se pueden producir una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial.

Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio se vuelva inhóspito para el crecimiento microbiano, por ejemplo, por un cambio en el pH. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en los ambientes naturales.

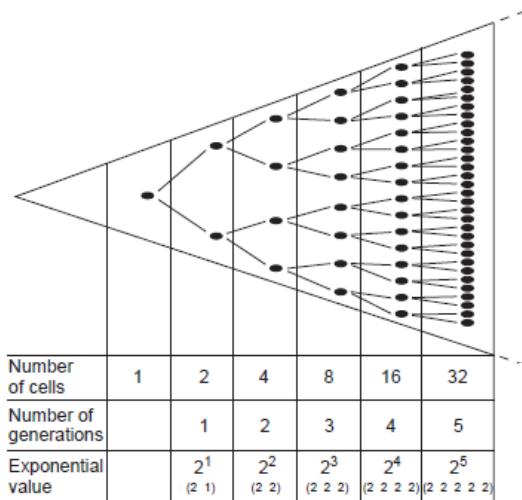
4.- Fase de muerte donde se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo. Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse. Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad metabólica que se traduzca, por ejemplo, en liberación de toxinas.



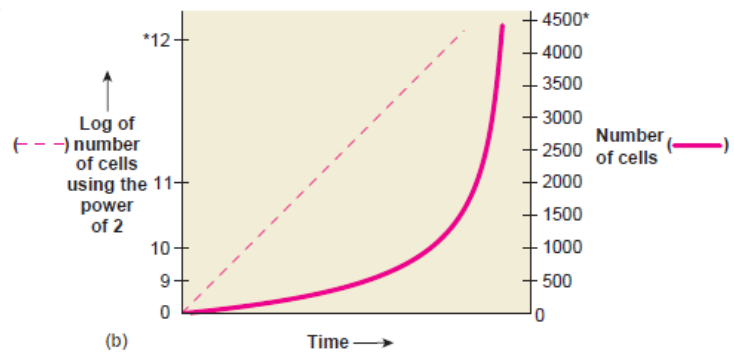
## Velocidad de crecimiento

El tiempo necesario para que un microorganismo complete un ciclo celular y realice la fisión dando dos células hijas nuevas, se llama tiempo de generación o tiempo de duplicación. El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos los individuos de dicha población. En las bacterias, por cada ciclo nuevo de división la población aumenta por un factor de 2. Por lo tanto, si comenzamos el cultivo con una única célula, la primera generación dará

2 células, la segunda 4, la tercera 8, a continuación 16, 32, 64, y así sucesivamente. Mientras el medio ambiente siga siendo favorable, este efecto de duplicación puede continuar a una velocidad constante.



(a)



Tratamiento matemático del crecimiento bacteriano

El tiempo de generación es una medida de la tasa o velocidad de crecimiento de un organismo. En comparación con las tasas de crecimiento de la mayoría de los demás seres vivos, las bacterias se duplican muy rápidamente. El tiempo medio de generación es de 30 a 60 minutos en condiciones óptimas. Los tiempos más cortos de generación son de 5 a 10 minutos, y los tiempos de generación más largos requieren días. Por ejemplo, *Mycobacterium leprae* tiene un tiempo de generación de 10 a 30 días. La mayoría de los patógenos tienen tiempos de duplicación relativamente cortos. *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*, bacterias que causan enfermedades transmitidas por alimentos, se duplican en 20 a 30 minutos, lo que explica por qué dejar la comida a temperatura ambiente, aunque sea por un corto período de tiempo puede permitir que una contaminación se propague. En unas pocas horas, una población de estas bacterias puede crecer fácilmente a partir de un pequeño número de células a varios millones.

### Estudio del crecimiento como progresión geométrica

Las bacterias crecen siguiendo una progresión geométrica de base 2 en la que el número de individuos se duplica al cabo de un tiempo determinado denominado tiempo de generación ( $g$ ). De esta forma, podemos calcular el número de bacterias ( $N$ ) al cabo de un número de generaciones ( $n$ ) usando la siguiente ecuación:

$$N = N_0 2^n \quad \text{(ecuación 1)}$$

$N_0$  es el número de células en el momento inicial. El número de generaciones se puede calcular de la siguiente forma:

$$n = t / g \quad \text{(ecuación 2)}$$

Donde  $t$  es el tiempo transcurrido.

Por consiguiente, combinando las ecuaciones 1 y 2:

$$N = N_0 2^{t/g} \quad \text{(ecuación 3)}$$

Las ecuaciones exponenciales son muy difíciles de manejar gráficamente, por ello es mejor transformarlas en otras más simples. Para transformar una ecuación exponencial en una recta, tomamos logaritmos en los dos términos y resulta:

$$\ln N = \ln N_0 + (t/g) \ln 2 \quad (\text{ecuación 4})$$

Entonces el logaritmo del número de células crece linealmente con el tiempo a razón de una constante igual a  $\ln 2/g$ .

En un crecimiento equilibrado, todos los parámetros de crecimiento (número de células, biomasa de cultivo, acumulación de metabolitos primarios, proteínas, ácidos nucleicos etc.) evolucionan en paralelo. Por lo tanto, en la ecuación anterior N puede representar cualquiera de los factores que utilicemos para monitorear el crecimiento como se describe más abajo.

### **Análisis del crecimiento en función de la tasa de crecimiento $\mu$**

Otra forma de representar la cinética es considerando el incremento en el número de células (dN) en un intervalo corto de tiempo (dt). En este caso, la ecuación que describe la cinética del crecimiento es la siguiente:

$$dN/dt = \mu N \quad (\text{ecuación 5})$$

En este caso el incremento del número de células (dN) por unidad de tiempo (dt) es proporcional al número de células presentes en el cultivo (N). A la constante de proporcionalidad ( $\mu$ ) se le denomina tasa o velocidad de crecimiento. Integrando la ecuación anterior durante el tiempo de cultivo, se transforma en la siguiente función exponencial:

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (\text{ecuación 6})$$

La transformación de esta ecuación en una recta (tomando logaritmos) rinde lo siguiente:

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t \quad (\text{ecuación 7})$$

O sea, el incremento del logaritmo del número de células aumenta linealmente con el tiempo siendo la constante de proporcionalidad  $\mu$ . Comparando esta ecuación (7) con la similar presentada más arriba (4), podemos concluir que:

$$\mu = \ln 2/g \quad \text{o} \quad g = \ln 2/\mu.$$

Es decir, que hay una correlación inversa entre el valor de la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de generación (g). Estas ecuaciones nos permiten predecir cuál será el número de células, masa celular, etc. después de un cierto tiempo de cultivo (t) si conocemos  $\mu$ ; o bien, poder calcular la tasa de crecimiento  $\mu$  a partir de medidas experimentales del incremento en el número de células, biomasa, etc.

## Cuantificación del crecimiento bacteriano

Existen diferentes maneras para monitorear y medir el crecimiento de microorganismos. Los principales, se enumeran a continuación:

1.- Recuento directo: consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de bacterias. Se usan unos portaobjetos especiales denominados cámaras de Petroff-Hausser. Para que la medida sea correcta es necesario que la densidad de células sea del orden de  $10^5$  por ml.



2.- Medida de la masa de células: el sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando turbidez. La turbidez depende de la cantidad de partículas o sea de la masa en suspensión, por tanto, midiendo la absorbancia o densidad óptica (DO) se puede estimar la masa de las bacterias. Este es el parámetro de medida más fácil de usar en los cultivos de laboratorio. Se debe usar una longitud de onda donde las células no absorban la luz, por lo general se usa 600 nm. Especial cuidado hay que tener con las bacterias pigmentadas. Recordar que, dependiendo del equipo usado, la absorbancia medida no debe superar el valor de 1 para tener una respuesta lineal. Para cultivos muy densos se debe diluir con medio fresco antes de medir.

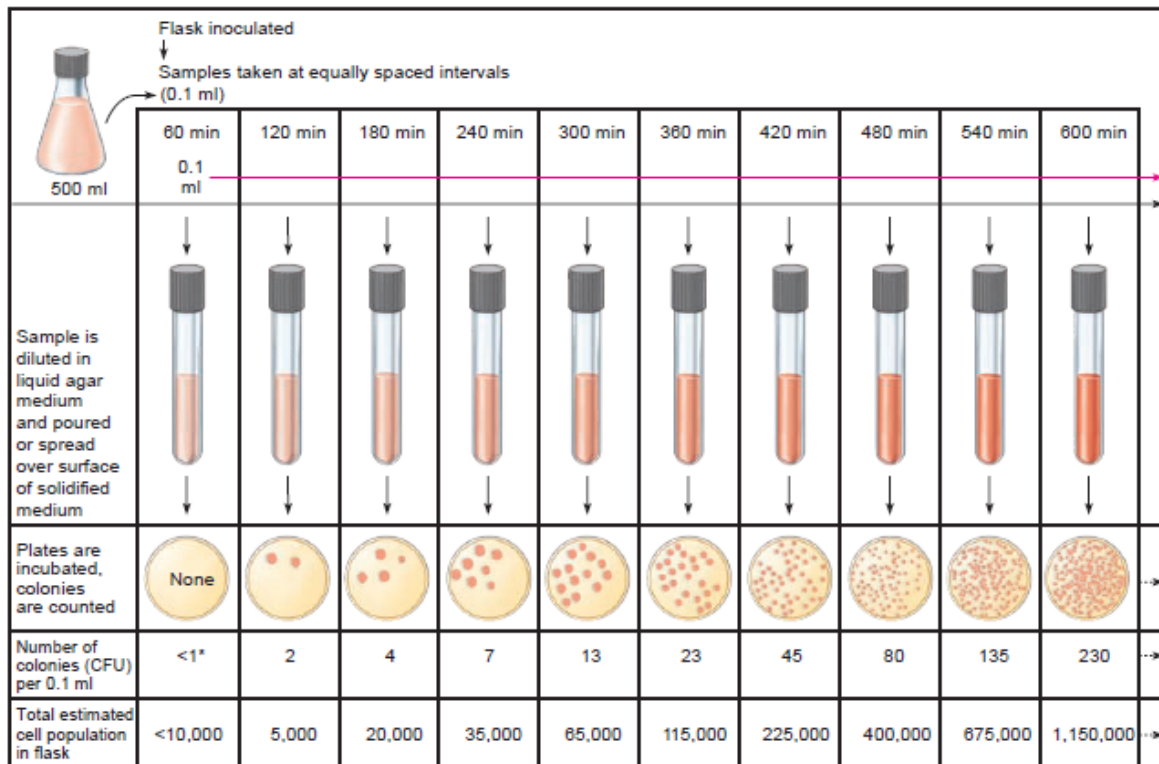


3.- Recuento de viables: consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de microorganismos viables contando el número de colonias que se forman asumiendo que cada una de estas deriva de una célula aislada. Para que la medida sea correcta desde el punto de vista estadístico, es necesario contar entre 30-300 unidades formadoras de colonias (UFC) por placa. En ciertas ocasiones en las que la densidad de microorganismos es demasiado baja, éstos se pueden recolectar por filtración a través de una membrana (de  $0.2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro) y posterior colocación de la membrana en un medio de cultivo adecuado para que se formen las colonias.

Debido a que la UFC de algunas bacterias en realidad está compuesto de varias células (por ejemplo, considerar la disposición agrupada de *Staphylococcus*), utilizando un recuento de colonias puede subestimar el tamaño exacto de la población hasta cierto punto. Esto es un problema en bacterias filamentosas como las del género *Streptomyces* para las cuales hay que utilizar otro parámetro de medida para la cuantificación del crecimiento.

4.- Medida del número de partículas usando contadores electrónicos de partículas. Estos sistemas no nos indican si las partículas corresponden a células vivas o muertas; pero nos pueden dar una idea del tamaño de las partículas.

5.- Medida de parámetros bioquímicos tales como la cantidad de ADN, ARN, proteínas, peptidoglicano, etc. por unidad de volumen de cultivo.



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

### Importancia práctica de la curva de crecimiento

La tendencia de las poblaciones de exhibir las fases de crecimiento rápido, crecimiento lento, y la muerte tiene implicaciones importantes en el control microbiano, infección, microbiología de los alimentos, y microbiología industrial. Los agentes antimicrobianos como el calor y desinfectantes aceleran rápidamente la fase de muerte en todas las poblaciones, pero los microbios en la fase de crecimiento exponencial son más vulnerables a estos agentes que son los que han entrado en la fase estacionaria. En general, las células en crecimiento activo son más vulnerables a las condiciones que alteran el metabolismo celular y la fisión binaria.

Es importante conocer la cinética de crecimiento de los cultivos microbianos para predecir cómo va a evolucionar un cultivo, cómo se consume el substrato y se van acumulando los productos del metabolismo. Sin conocer estos factores es muy imprudente iniciar el cultivo en un fermentador de 10.000 litros, por ejemplo, con el costo que ello supone, puesto que no podemos predecir qué va a pasar, cuándo va a completarse el crecimiento, cómo se va a acumular el producto, etc.

Para ciertas aplicaciones de investigación o industriales, el cultivo por lotes cerrados con sus cuatro fases de crecimiento es ineficiente. Una alternativa es utilizar un sistema de cultivo continuo mediante una cámara de crecimiento automático llamado quimiostato. Este dispositivo puede admitir un flujo constante de nuevos nutrientes y desviar los medios utilizados y las células bacterianas viejas, estabilizando así la tasa de crecimiento y el número de células. El quimiostato es muy similar a fermentadores industriales utilizados para producir vitaminas y antibióticos. Tiene la ventaja de mantener el cultivo en un estado bioquímicamente activo y evitando que entren en la fase estacionaria o de muerte.

### Factores ambientales que influyen sobre el crecimiento de los microorganismos

Los microbios están expuestos a una amplia variedad de factores ambientales que afectan el crecimiento y la supervivencia. Ecología microbiana centra en las formas que los microorganismos se ocupan o se adaptan a factores tales como el calor, el frío, los gases, ácido, radiación, presiones osmóticas o hidrostáticas, e incluso otros microbios. La adaptación implica una modificación en la genética o bioquímica que permite la supervivencia y el crecimiento a largo plazo. Para la mayoría de los microbios, los factores ambientales afectan fundamentalmente la función de las enzimas

metabólicas. Por lo tanto, la supervivencia en gran medida es una cuestión de si los sistemas de enzimas de los microorganismos pueden seguir funcionando incluso en un entorno cambiante.

### Terminología

Gran parte del vocabulario para describir las adaptaciones microbianas se basa en algunas raíces de palabras comunes. Éstos se combinan de varias maneras que ayudan en la discusión de los tipos de adaptaciones nutricionales o ecológicas como se muestra en la siguiente lista.

Raíz	Significado	Ejemplo
trof-	Alimentación, nutrición	Trofozoito: la etapa de alimentación de protozoos
-filo	Amar	Extremófilo: un organismo que se ha adaptado a los ambientes extremos
hetero-	Otro	Heterótrofo: un organismo que requiere nutrientes procedentes de otros organismos
auto-	Uno mismo	Autótrofo: un organismo que "se alimenta por sí mismo"
photo-	Luz	Fotótrofo: un organismo que utiliza la luz como fuente de energía
quimio-	Químico	Quimiótrofo-un organismo que utiliza productos químicos en lugar de la luz para obtener energía
sapro-	Podrido	Saprófito: un organismo que vive de materia orgánica muerta
halo-	Sal	Halófilo: un organismo que puede crecer en ambientes de alta sal
termo-	Calor	Thermófilo: un organismo que crece a altas temperaturas
psychro-	Frío	Psychrophile: un organismo que crece a temperaturas frías
aero-	Aire (O <sub>2</sub> )	Aerobio-un organismo que utiliza el oxígeno en el metabolismo

Términos modificadores también se utilizan para especificar la naturaleza de las adaptaciones de un organismo. Obligado o estricto se refiere a estar restringido a un nicho estrecho o hábitat, tal como un termófilo obligado que requiere altas temperaturas para crecer. Por el contrario, facultativo significa no ser tan restringido, pero adaptándose a una gama más amplia de condiciones ambientales. Un halófilo facultativo puede crecer con o sin alta concentración de sal. La tolerancia es otro término que se puede utilizar para describir la capacidad de sobrevivir a una gama de condiciones.

### Adaptaciones a la temperatura

Las células microbianas no pueden controlar su temperatura y por lo tanto adquieren la temperatura ambiente de sus hábitats naturales. Es por esto que para sobrevivir tienen que adaptarse a las variaciones de temperatura donde se encuentran en su hábitat. Si estudiamos la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, podemos observar una temperatura mínima por debajo de la que no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular.

Dependiendo de sus hábitats naturales, algunos microbios tienen un rango de crecimiento estrecho y otros, más amplio. Algunos parásitos estrictos no crecerán si la temperatura varía más de unos pocos grados por debajo o por encima de la temperatura corporal del anfitrión.

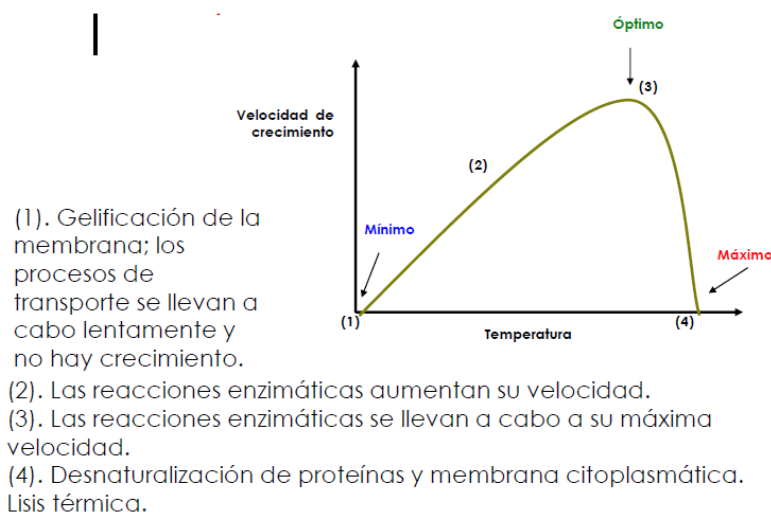
Hay varios tipos de microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima.

Un microorganismo psicrófilo tiene una temperatura óptima por debajo de 15 °C y es capaz de crecimiento a 0 °C. Es obligado con respecto al frío y por lo general no puede crecer por encima de 20 °C. El trabajo de laboratorio con psicrófilos puede ser un verdadero desafío. Las inoculaciones tienen que ser hechas en una habitación fría debido a la temperatura ambiente ordinaria puede ser letal para estos organismos. A diferencia de la mayoría de los cultivos de laboratorio, el

almacenamiento en el refrigerador incuba en lugar de que los inhibe. Como era de prever, los hábitats de las bacterias psicrófilos, hongos y algas son lagos, hielos polares, y las profundidades del océano. Los verdaderos psicrófilos deben distinguirse de psicrótrofos o psicrófilos facultativos que pueden crecer lentamente en el frío, pero que tienen una temperatura óptima por encima de 20 °C. Psicrótrofos tales como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* son una preocupación porque pueden crecer sobre los alimentos refrigerados y transmitir enfermedades.

La mayoría de los microorganismos medicamente relevantes son mesófilos y crecen a temperaturas intermedias. Aunque una especie individual puede crecer en los extremos de 10 °C o 50 °C, las temperaturas óptimas de crecimiento de la mayoría de mesófilos caen en la gama de 20 °C a 40 °C. Los organismos de este grupo habitan animales y plantas, así como el suelo y el agua en las zonas templadas, subtropicales y regiones tropicales.

Tipo de microorganismo	Temperatura mínima (°C)	Temperatura optima (°C)	Temperatura máxima (°C)
Psicrófilo	-5 +5	12 - 15	15 – 20
Psicrótrofo	-5 +5	25 - 30	30 – 35
Mesófilo	5 – 15	30 - 45	35 – 47
Termófilo	40 – 45	55 - 75	60 – 90



La mayoría de los patógenos humanos tienen una temperatura óptima entre 30 °C y 40 °C siendo la temperatura del cuerpo humano de 37 °C. Microbios termodúricos pueden sobrevivir a la exposición breve a altas temperaturas, pero normalmente son mesófilos, son contaminantes comunes de alimentos calientes o pasteurizados. Los ejemplos incluyen los quistes resistentes al calor, tales como *Giardia* o formadores de esporas, como *Bacillus* y *Clostridium*.

Un termófilo es un microbio que crece a temperaturas superiores a 45 °C. Estos microbios amantes del calor viven en el suelo y el agua asociada a la actividad volcánica, en pilas de compost, y en hábitats expuestos directamente al sol. Los termófilos pueden tener temperaturas de crecimiento entre 45 °C a 80 °C. La mayoría de las formas eucariotas no pueden sobrevivir por encima de 60 °C, pero unas pocas bacterias, llamados hiper termófilos pueden crecer a temperaturas entre 80 °C y 250 °C (en la actualidad se cree que es el límite de temperatura soportado por las enzimas y las estructuras celulares). Termófilos estrictos son tan tolerantes al calor que los investigadores pueden utilizar un dispositivo de esterilización de calor para aislarlos de la naturaleza.

Actualmente, hay un gran interés en los microorganismos termófilos por parte de las empresas de biotecnología. Uno de los descubrimientos más rentables hasta ahora era un termófilo, *Thermus aquaticus*, que posee una enzima (Taq polimerasa) que puede replicar el ADN a altas temperaturas y se la utiliza en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, un proceso utilizado en biología molecular y biotecnología.

Es importante tener en cuenta que, a temperaturas bajas, el metabolismo celular se enlentece y las células paran de crecer; aunque no tienen por qué morir. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar

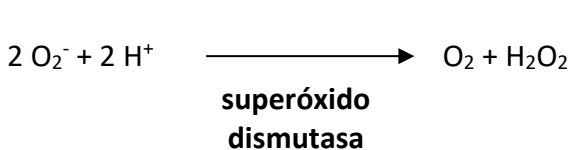
su capacidad de división si baja posteriormente la temperatura. Esto permite esterilizar por calor y no por frío.

### Requerimientos gaseosos: requerimientos de gases

Los gases atmosféricos que más influencia ejercen sobre el crecimiento microbiano son el oxígeno (O<sub>2</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). El oxígeno comprende aproximadamente 20% de la atmósfera y CO<sub>2</sub> aproximadamente 0,03%. El oxígeno tiene un gran impacto en la adaptación microbiana. Se trata de un gas respiratorio importante, y también es un agente oxidante potente que existe en muchas formas tóxicas. En general, los microbios caen en una de tres categorías:

- Microorganismos aerobios son aquellos que utilizan el oxígeno y puede eliminar su toxicidad. Un organismo que no puede crecer sin oxígeno es un aerobio obligado. La mayoría de los hongos y los protozoos, así como muchas bacterias (géneros *Micrococcus* y *Bacillus*), tienen estrictos requisitos de oxígeno en su metabolismo.
- Anaerobios facultativos son aerobios que pueden utilizar el oxígeno para crecer, pero también es capaz de crecer en ausencia del mismo. Este tipo de organismo utiliza el oxígeno para la respiración aeróbica cuando está presente, pero en su ausencia, adopta un modo anaeróbico del metabolismo tales como la fermentación. Anaerobios facultativos por lo general poseen catalasa y superóxido dismutasa. Un número de bacterias patógenas caen en este grupo que incluye bacterias y estafilococos intestinales gram-negativos.
- Microaerófilos son aquellos que no crece a concentraciones atmosféricas normales de oxígeno, sino que requiere una pequeña cantidad de ella (1-15%) en el metabolismo. La mayoría de los organismos en esta categoría viven en un hábitat como el suelo, el agua o el cuerpo humano que proporciona pequeñas cantidades de oxígeno, pero no están directamente expuestos a la atmósfera.
- Anaerobios aerotolerantes no utilizan oxígeno, pero pueden sobrevivir y crecer en su presencia. Estos anaerobios no se ven perjudicados por el oxígeno, y algunos de ellos poseen mecanismos alternativos para descomponer el peróxido y superóxido. Por ejemplo, los lactobacilos, que son residentes comunes del intestino, inactivan estos compuestos con iones de manganeso.
- Anaeróbios estrictos o anaeróbios obligados son los microorganismos que no pueden ni utilizar el oxígeno ni eliminar su toxicidad. Estos microorganismos carecen de los sistemas de enzimas metabólicas para el uso de oxígeno en la respiración. Debido a que también carecen de las enzimas para procesar los derivados tóxicos del oxígeno, no pueden tolerar ningún oxígeno libre en el entorno inmediato y morirán si se expone al mismo. Los anaerobios estrictos viven en hábitats muy reducidos, como lodos profundos, lagos, océanos y suelos. Para crecer bacterias anaerobias estrictas por lo general se requiere de cámaras especiales que excluyen el oxígeno para su manipulación e incubación.

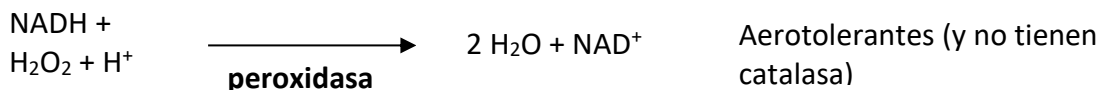
Durante las reacciones celulares el oxígeno se puede transformar en varios productos tóxicos. El oxígeno singlete (O<sub>2</sub>) es una molécula muy reactiva producida por procesos vivos y no vivos. La acumulación de oxígeno singlete puede provocar la oxidación de los lípidos de membrana y otras moléculas y destruir una célula. Otros subproductos altamente reactivos del oxígeno son el ion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y el radical hidroxilo (OH). La mayoría de las células han desarrollado enzimas que se encargan de neutralizar estos productos químicos. La conversión completa de ion superóxido en oxígeno inocuo implica un proceso de dos pasos y al menos dos enzimas:



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



Aerobios y facultativos



En esta serie de reacciones esenciales para organismos aerobios, el ion superóxido es primero convertido a peróxido de hidrógeno y oxígeno, por la acción de una enzima llamada superóxido dismutasa. Debido a que el peróxido de hidrógeno también es tóxico para las células (se utiliza como desinfectante y antiséptico) debe ser degradado por una enzima ya sea catalasa o peroxidasa en agua y oxígeno. Si un microbio no es capaz de lidiar con estos derivados tóxicos del oxígeno por estos mecanismos o alternativos, se restringe a los hábitats libres de oxígeno.

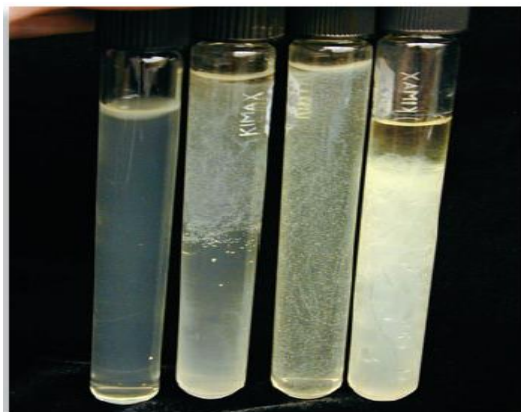
A pesar de que las células humanas utilizan el oxígeno, y el oxígeno se encuentra en la sangre y los tejidos, algunos sitios del cuerpo presentan bolsillos o micro hábitats donde puede ocurrir la colonización o infección por anaerobios. La caries dental se debe en parte a las complejas acciones de bacterias aeróbicas y anaeróbicas en la placa. La mayoría de las infecciones gingivales se componen de mezclas similares de bacterias orales que han invadido tejidos de las encías dañadas. Otro lugar común para las infecciones anaeróbicas es el intestino grueso, un hábitat relativamente libre de oxígeno que alberga una rica variedad de bacterias anaerobias estrictas. Infecciones anaerobias pueden ocurrir después de la cirugía abdominal y lesiones traumáticas (gangrena gaseosa y tétanos).

La determinación de las necesidades de oxígeno de un microbio desde un punto de vista bioquímico puede ser un proceso que consume mucho tiempo. Una aclaración inicial proviene de cultivos hechos con medios que contienen un producto químico que permite la eliminación de oxígeno, tal como tioglicolato. La ubicación de crecimiento en un tubo de medio de tioglicolato líquido es un buen indicador de la adaptación de un organismo para el uso de oxígeno.

Aunque todos los microbios requieren algo de dióxido de carbono en su metabolismo, capnófilos crecen mejor a las tensiones de CO<sub>2</sub> más altas (3-10%) que las que normalmente están presentes en la atmósfera (0,033%). Esto es importante en el aislamiento inicial de algunos patógenos de muestras clínicas, especialmente *Neisseria* (gonorrea, meningitis), *Brucella* (fiebre ondulante) y *Streptococcus pneumoniae*. La incubación se lleva a cabo en un incubador de CO<sub>2</sub> que proporciona el rango correcto de CO<sub>2</sub>. Además, es importante recordar que el CO<sub>2</sub> es un nutriente esencial para los autótrofos, que lo utilizan para sintetizar compuestos orgánicos.

### Efectos del pH

Crecimiento y supervivencia microbiana también está afectada por el pH del hábitat. La mayoría de los organismos vivos crecen en hábitats de pH entre 6 y 8, porque los ácidos y bases fuertes pueden ser altamente perjudicial para las enzimas y otras sustancias celulares. Estos microbios son los neutrófilos que viven en hábitats de pH alrededor de 7. Aunque existen otros que viven en



hábitats menos comunes como las turberas ácidas, lagos y suelos alcalinos. Acidófilos obligados incluyen *Euglena mutabilis*, un alga que crece en piscinas de ácido entre 0 y 1,0 de pH, y *Thermoplasma*, una arquea que carece de una pared celular, vive en pilas de carbón caliente a un pH de 1 a 2, y se lisa si se expone a pH 7. Unas pocas especies de algas y bacterias pueden sobrevivir en realidad a un pH cerca de la del ácido clorhídrico concentrado. No sólo requieren un pH tan baja para el crecimiento, pero en particular las bacterias realmente ayudan a mantener el pH bajo por la liberación de ácido

fuerte. Debido a que muchos mohos y levaduras toleran acidez moderada, son los agentes de deterioro más comunes de los alimentos en escabeche.

Alcalinófilos viven en las piscinas calientes y suelos que contienen altos niveles de minerales básicos (hasta pH 10,0). Las bacterias que descomponen la orina crean condiciones alcalinas, porque se puede producir amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) cuando se digiere la urea. El metabolismo de la urea es una manera de que *Proteus* spp. puede neutralizar la acidez de la orina para colonizar e infectar el sistema urinario.

Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de crecimiento suele tender a bajar durante el cultivo. Por otra parte, la bajada del pH del medio que producen ciertos microorganismos les confiere una ventaja selectiva frente a otros microorganismos competidores. Así, por ejemplo, las bacterias lácticas que producen grandes cantidades de ácido láctico como consecuencia de su metabolismo primario reducen el pH del medio de cultivo a valores inferiores a los soportables por otras bacterias competidoras (llegan a bajar el pH del medio hasta 4.5). De esta forma, las bacterias competidoras mueren y las lácticas se convierten en la población dominante.

El efecto letal del pH ácido sobre los microorganismos tiene aplicación en la conservación de alimentos acidificándolos. De esta forma, la adición de ácido acético en forma de vinagre permite la conservación de alimentos perecederos (escabeches, por ejemplo) y la producción de ácidos en el curso de fermentaciones naturales permite alargar la vida de los alimentos (coles fermentadas, por ejemplo).

### Presión osmótica

La mayoría de los microbios viven en condiciones hipotónicas o isotónicas, aunque algunos llamados osmófilos, viven en hábitats con una alta concentración de soluto. Un tipo común de osmófilo requiere altas concentraciones de sal; estos organismos se llaman halófilos. Halófilos obligados como *Halobacterium* y *Halococcus* habitan lagos de sal, lagunas y otros hábitats hipersalinos. Crecen de manera óptima en soluciones de 25% de NaCl, pero requieren al menos 9% de NaCl (en combinación con otras sales) para el crecimiento. Estas arqueas tienen modificaciones significativas en sus paredes celulares y membranas, y se lisan en hábitats hipotónicos.

Algunos microbios se adaptan a las concentraciones amplias de solutos. Estos se llaman osmotolerantes. Dichos organismos son muy resistentes a la sal, a pesar de que normalmente no residen en entornos de alto contenido de sal. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* puede crecer en medios de NaCl que van desde 0,1% hasta 20%. Aunque es común el uso de altas concentraciones de sal y azúcar para conservar los alimentos (jaleas, jarabes, y salmueras), muchas bacterias y hongos en realidad prosperan en estas condiciones y son agentes de descomposición comunes.

### Presión atmosférica

El descenso en las profundidades del océano somete a los microorganismos a un aumento en la presión hidrostática. Existen microbios de aguas profundas llamados barófilos que viven bajo presiones mucho más alta que la atmosférica. Los biólogos marinos que muestrean zonas de aguas profundas a 10 km debajo de la superficie han aislado eucariotas inusuales llamados foraminíferos que estaban siendo expuestos a presiones de 1.100 veces a las normales. Estos microbios se han adaptado de manera estricta a las altas presiones y suelen romperse cuando se expone a la presión atmosférica normal.

## Capítulo IV

### Ecología microbiana

El mundo de los microbios está constituido por diversos grupos que reflejan adaptaciones tanto morfológicas como fisiológicas que los hacen compatibles con sus hábitats. Los microorganismos adaptados a crecer bajo determinadas condiciones ambientales del hábitat son capaces de sobrevivir. En este caso se dice que la población indígena o autóctona del hábitat posee características adaptativas. En algunos hábitats las condiciones ambientales son tan severas que solo un reducido número de poblaciones microbianas es capaz de sobrevivir; e incluso puede ocurrir que el hábitat seleccione solo un tipo de bacteria. Por ejemplo, *Sulfolobus* y *Chloroflexus* son encontrados como comunidades dominantes en manantiales sulfurosos cuya temperatura es superior a los 100°C; condiciones letales para otras bacterias. Sin embargo, en ambientes menos extremos, donde la presión de selección natural es menos severa, la diversidad de la comunidad microbiana es extraordinaria haciendo dificultoso aislar e investigar las distintas poblaciones autóctonas en una muestra a partir de técnicas estándar de aislamiento y condiciones de crecimiento. Frecuentemente los microbios de mayor interés están presentes en bajo número en un hábitat determinado y su presencia es enmascarada por la población dominante. Sin embargo, es posible crear condiciones de cultivo artificiales que favorezcan el crecimiento del tipo particular de microbio de interés. Esto se ha logrado mediante técnicas de **cultivo de enriquecimiento**. Mediante ellas se recrean las condiciones ambientales que permiten un rápido crecimiento y eclosión del tipo de microbio de interés.

#### Ecosistemas y ciclos de los elementos.

Los organismos fotosintetizadores como las plantas son productores de oxígeno y además de posibilitar la vida aeróbica, constituyen el nexo por el cual la energía radiante “inmaterial” es transformada en energía química (ATP) y poder reductor, a partir de los cuales se produce la biosíntesis de compuestos orgánicos. La atmósfera aeróbica generada, y la materia orgánica son los sustratos básicos para la vida heterotrófica, que da lugar al desarrollo de los animales y entre éstos, al hombre. Los animales, como producto de su metabolismo provocan la liberación a la atmósfera de dióxido de carbono, el cual es re-asimilado por las plantas verdes para la producción de material orgánico.

Sin embargo, es necesario incluir también en este escenario a los microorganismos. Éstos se suman al engranaje biológico para constituir un verdadero ecosistema integrado ahora, no solamente por plantas verdes y animales; sino también y en igual grado de compromiso, por protozoos, algas inferiores, bacterias, hongos y, entre todos ellos, el medio ambiente.

La importancia de las bacterias en el ecosistema queda en evidencia por ejemplo en el caso de la síntesis de materia orgánica que realizan las plantas verdes, la cual sólo puede ocurrir en la interacción con las bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>. Estas suministran el nitrógeno en forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a las plantas, incapaces de hacerlo asequible por otra vía; mientras que las plantas le entregan a dichas bacterias diversos compuestos carbonados como proteínas, factores de crecimiento y minerales, imprescindibles para su propio desarrollo.

Así, también es fundamental el rol desempeñado por las enterobacterias sintetizadoras de vitamina K, la cual es absorbida por sus huéspedes y cumple una función esencial en el proceso de biosíntesis de protrombina. Este compuesto representa un factor indispensable del mecanismo de coagulación y además interviene como precursor de algunos intermediarios de la ruta del transporte electrónico de la cadena respiratoria.

Otro ejemplo de asociación simbiótica entre el hombre y su flora microbiana lo constituye la flora oral sobre la producción de caries. El hombre al aportar azúcares a su dieta favorece el desarrollo de bacterias que por fermentación producen ácido láctico y crean, al destruir el esmalte dental, el microambiente necesario para el establecimiento de otras colonias. Estas irán destruyendo la matriz con sus enzimas proteolíticas, proceso a su vez posibilitado por otro grupo de bacterias productoras de un polisacárido cementante, que permite la fijación. Se constituye así poco a poco y en el marco de estas interrelaciones, lo que normalmente denominamos caries dentales.

En otra categoría de relaciones simbióticas, ubicamos a la endosimbiosis de bacterias que coexisten en el interior celular de un insecto, en donde colaboran en el metabolismo celular con la producción de vitaminas, degradación de metabolitos nitrogenados, e interconversión de productos para su posterior excreción, lo cual determina el normal desarrollo del hospedador. Sin la existencia de éstos, sus parásitos intracelulares, la estructura corporal de los insectos se reduciría en más del 80%.

El ciclo fundamental de energía y materiales dentro del ecosistema va desde el Sol y la Tierra a lo autótrofo, desde éste al heterótrofo, desde el heterótrofo de nuevo a la Tierra, y así indefinidamente. El aporte gradual de nueva energía a partir del Sol le confiere poder al ciclo, pero conlleva a la inevitable pérdida de energía que sale del sistema en forma de calor no recuperable. La vida autótrofa comienza con la captación de la luz solar y minerales provocando por posteriores transformaciones, la liberación de calor al medio, la síntesis de ATP como energía disponible o de NADPH como poder biosintetizador; a partir de los cuales “fabrican” sustancias nutritivas. Dichas sustancias están en estado reducido, y al ser tomadas por los heterótrofos brindarán como producto final de su metabolismo  $\text{CO}_2$ , que es entregado a la atmósfera. Así es que, en definitiva, la energía fijada en un principio por los organismos “autosuficientes” es disipada en última instancia como calor, mientras que los elementos químicos que sirven como nutrientes no se pierden para el ecosistema. Por esto es correcto hablar de que la energía fluye a través de ecosistema, mientras que los elementos químicos se ciclan dentro del mismo.

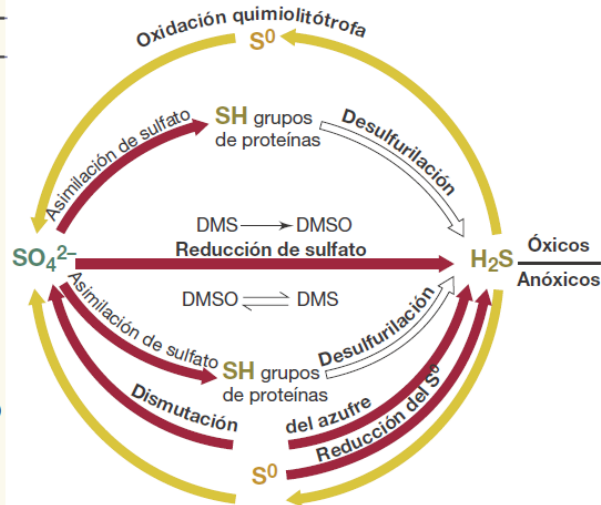
El planeta Tierra actúa como un sistema cerrado en el que las cantidades de materia permanecen constantes. Sin embargo, sí existen continuos cambios en el estado químico de la materia produciéndose formas que van desde un simple compuesto químico a compuestos complejos contruidos a partir de esos elementos. Algunas formas de vida, especialmente las plantas y muchos microorganismos, usan compuestos inorgánicos como nutrientes. Los animales requieren compuestos orgánicos más complejos para su nutrición. La vida sobre la Tierra depende del ciclo de los elementos químicos que va desde su estado elemental pasando a compuesto inorgánico y de ahí a compuesto orgánico para volver a su estado elemental. Los microorganismos son esenciales en estas transformaciones químicas.

En algunas partes del ciclo el elemento se oxida ( $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_3^-$ ;  $\text{S}^{2-} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$ ;  $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ;  $\text{CH}_4 \rightarrow \text{CO}_2$ ), mientras que en otras se reduce, dando esto una idea de la existencia de un **ciclo biogeoquímico**. En el mismo existe una transformación química gradual de los elementos al pasar de un organismo a otro, ya que cada ser viviente se halla adaptado a la utilización de cada elemento en un diferente estado de reducción para incorporarlo a su proceso metabólico propio.

### Ciclo del azufre

El ciclo del azufre representa una herramienta muy útil para la comprensión de estas interrelaciones y una interpretación dinámica del ecosistema. El S es un elemento esencial en los materiales biológicos y es encontrado en distintos compuestos, tales como vitaminas, coenzimas y proteínas (en los aminoácidos metionina y cisteína). Este elemento puede existir en diferentes estados de oxidación pero, en la naturaleza, solo tres de ellos parecen tener relevancia ecológica. Estos son los estados de oxidación 0 ( $\text{S}^0$ ), el estado de oxidación II (como  $\text{HS}^-$  o como  $\text{H}_2\text{S}$ ) y el estado de oxidación VI ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Los otros estados de oxidación tienen importancia bioquímica en el metabolismo intermediario del S, pero en cuanto a su significado ecológico no es directo.

Procesos clave y procariotas del ciclo del azufre	
Procesos	Organismos
Oxidación de sulfuro/azufre ( $H_2S \rightarrow S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$ )	
Aerobia	Quimiolitótrofos del azufre ( <i>Thiobacillus</i> , <i>Beggiatoa</i> , otros)
Anaerobia	Bacteria fotótrofos verdes y púrpuras, algunos quimiolitótrofos
Reducción de sulfato (anaerobia) ( $SO_4^{2-} \rightarrow H_2S$ )	
	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfobacter</i> <i>Archaeoglobus</i> (Archaea)
Reducción de azufre (anaerobia) ( $S^0 \rightarrow H_2S$ )	
	<i>Desulfuromonas</i> , muchas Archaea hipertermófilas
Disminución del azufre ( $S_2O_3^{2-} \rightarrow H_2S + SO_4^{2-}$ )	
	<i>Desulfovibrio</i> , y otros
Oxidación o reducción de compuestos orgánicos ( $CH_3SH \rightarrow CO_2 + H_2S$ ) azufrados ( $DMSO \rightarrow DMS$ )	
	Muchos organismos pueden hacerlo
Desulfurilación (S orgánico $\rightarrow H_2S$ )	
	Muchos organismos pueden hacerlo



El  $SO_4^{2-}$  es uno de los aniones más comunes del agua. La mayor parte de los microorganismos (1a) y las plantas (1b) pueden usar el  $SO_4^{2-}$  como única fuente de S, incorporándolo a sus compuestos orgánicos e inorgánicos como  $S^{2-}$ .

Muchos microorganismos pueden producir  $H_2S$  (1c) y (1d), lo que tiene considerable importancia debido a que es una sustancia tóxica para la mayoría de los aerobios, y porque además reacciona y precipita con muchos iones metálicos del interior celular. Sin embargo, el  $H_2S$  es inestable en un medio ambiente aeróbico, oxidándose a  $S^0$  o a  $SO_4^{2-}$ ; ya sea espontáneamente o bien, a través de procesos bioquímicos. Por lo tanto, el  $H_2S$  sólo se acumula en medios anaerobios. Este compuesto es producido microbiológicamente por dos sistemas diferentes:

- Putrefacción, que es el proceso que lleva a cabo la descomposición de compuestos orgánicos, y entre éstos, los que contienen azufre.
- Reducción desasimiladora de  $SO_4^{2-}$  (1d).

Los organismos responsables de la reducción de  $SO_4^{2-}$  son anaerobios estrictos, habitualmente miembros del género *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*, que utilizan  $SO_4^{2-}$  como aceptor final de electrones en lugar de  $O_2$ . Los donadores de electrones empleados en el proceso son compuestos orgánicos o  $H_2$ , y es por ello que estos microorganismos se encuentran habitualmente donde las concentraciones de sustratos orgánicos son relativamente elevadas. Una de las consecuencias de la producción de  $H_2S$  es la formación de sulfuros metálicos tales como  $FeS$  y  $CuS$ , y como el Fe es muy común en todos los sedimentos, la producción de  $H_2S$  está siempre acompañada de  $FeS$  responsable de la mayor parte del color negro de los fangos anaerobios.

El  $H_2S$  formado se oxida espontáneamente en el aire dando  $S^0$  y  $H_2O$ , por lo que las bacterias oxidantes de S (1e) que realizan el mismo proceso, viven principalmente en la región donde el  $H_2S$  ascendente de las zonas anaerobias se encuentra con en  $O_2$  descendente de las aerobias. Dentro de este grupo de microorganismo tenemos a las bacterias filamentosas del género *Beggiatoa* y *Thiothrix* y bacilos del género *Thiobacillus*. Estos microorganismos son **quimiolitótrofos aerobios**, es decir, usan el  $H_2S$  como dador de energía. Muchos de estos organismos acumulan  $S^0$ , y cuando se acaba el  $H_2S$  disponible en el medio usan a este último oxidándolo a  $SO_4^{2-}$ . Si hay luz disponible el  $H_2S$  puede ser oxidado anaeróticamente, por las bacterias fotosintetizadoras (1f), que son encontradas muy a menudo en profundidades donde todavía penetra la luz, y donde hay  $H_2S$  del fondo disponible. Este, es aquí utilizado como dador de electrones (en lugar del agua) en el proceso fotosintético. Entre éstas últimas tenemos bacterias fotosintetizadoras púrpuras de  $S^0$  (de la familia *Chromateaceae*); verdes del S (de la familia *Chlorobaceae*), ambas **fotolitótrofos obligadas**;

bacterias fotosintetizadoras púrpuras no del S (de la familia *Rhodospirillaceae*), que son **fotoorganótrofas**, aunque también pueden vivir aeróbicamente como **quimioorganótrofas** y bacterias verdes no del S (*Chloroflexus*) que pueden vivir fotolitotróficamente en anaerobiosis, también como **fotoorganótrofos** y hasta, en condiciones aerobias como **quimioorganótrofo**.

Cuando los organismos oxidadores de S convierten el  $H_2S$  en  $SO_4^{2-}$  se produce un marcado descenso del pH (aproximadamente  $pH=1$  o  $2$ ), hecho que constituye un serio inconveniente para el desarrollo de muchas formas de vida, y de aquí que este evento sea poco deseable. Sin embargo, la capacidad de ciertas bacterias oxidadoras de  $S^0$  para producir  $H_2SO_4$  es utilizada a veces en agricultura para los suelos alcalinos, de manera que con el arado se introduce en el suelo  $S^0$  en polvo, y las sulfobacterias naturalmente presentes en el suelo lo oxidan y disminuyen el pH, a valores más adecuados para los cultivos agrícolas.

Como vemos, la transformación cíclica del S en la biosfera es llevada a cabo por distintos grupos de microorganismos. Algunos de éstos pueden ser convenientemente estudiados por el establecimiento de un pequeño sistema ecológico que reproduce el ciclo biogeoquímico de S. Es posible crear en el laboratorio un modelo de este tipo, que reproduce prácticamente las mismas condiciones ambientales de las poblaciones microbianas y no sólo posibilita el seguimiento, para nada despreciable del desarrollo del ecosistema generado, sino que también constituye en sí un método de enriquecimiento de ciertas poblaciones microbianas que en sus hábitat naturales se encuentran en baja proporción; y que además hacen dificultoso el estudio e identificación partiendo de su nicho habitual.

### **Columna de Winogradsky.**

Fue Sergei Winogradsky en 1877 quien introdujo la "Columna de Winogradsky" como un método válido de enriquecimiento de cultivo para el establecimiento de diferentes poblaciones microbianas utilizando el ciclo del azufre, y quien a través de la caracterización de las mismas descubrió una sorprendente variedad de modelos metabólicos desconocidos algunos de ellos hasta entonces, y por los cuales los distintos grupos se adaptan a un nicho ecológico definido.

A partir de sus observaciones experimentales propone por vez primera el concepto de que la oxidación de compuestos inorgánicos puede proporcionar una fuente de energía para ciertos microorganismos. Esto amplía el espectro de autotrofia con la introducción del concepto de quimioautótrofo.

La columna de Winogradsky es una demostración clásica y simple que pretende reproducir en el laboratorio una porción de ecosistema, facilitando así su estudio y caracterización. Así, pone en evidencia que los microorganismos ocupan "microespacios" altamente específicos de acuerdo con sus tolerancias medioambientales y sus necesidades vitales (requerimientos de carbono y energía) y además, ilustra cómo diferentes microorganismos desarrollan sus ciclos y la interdependencia que se genera entre ellos (las actividades de un microorganismo permite crecer a otro y viceversa). Esta columna es un sistema completo y autónomo de reciclamiento, mantenido sólo por la energía de la luz. Por otra parte, la columna de Winogradsky puede ser considerada asimismo un sistema que permite el enriquecimiento de grupos bacterianos particulares. Así, los microorganismos que desarrollen en ella serán el reflejo de las fuentes de carbono y energía que hayan sido introducidas inicialmente, así como las condiciones de mantenimiento.

Su método consiste en establecer en un tubo de vidrio, y por esto llamado "Columna de Winogradsky", un microambiente acuático complementado con algunos compuestos que suministren un gradiente de  $H_2S$  por un largo periodo de tiempo, como así también, material orgánico que enriquecerá el crecimiento microbiano.

En una columna estándar construida utilizando barro, agua estancada y luz blanca (tal como se efectuará en el práctico), desarrollarán grupos bacterianos ya caracterizados. Veamos a continuación las características de los mismos:

## Microorganismos preponderantes del ciclo del S

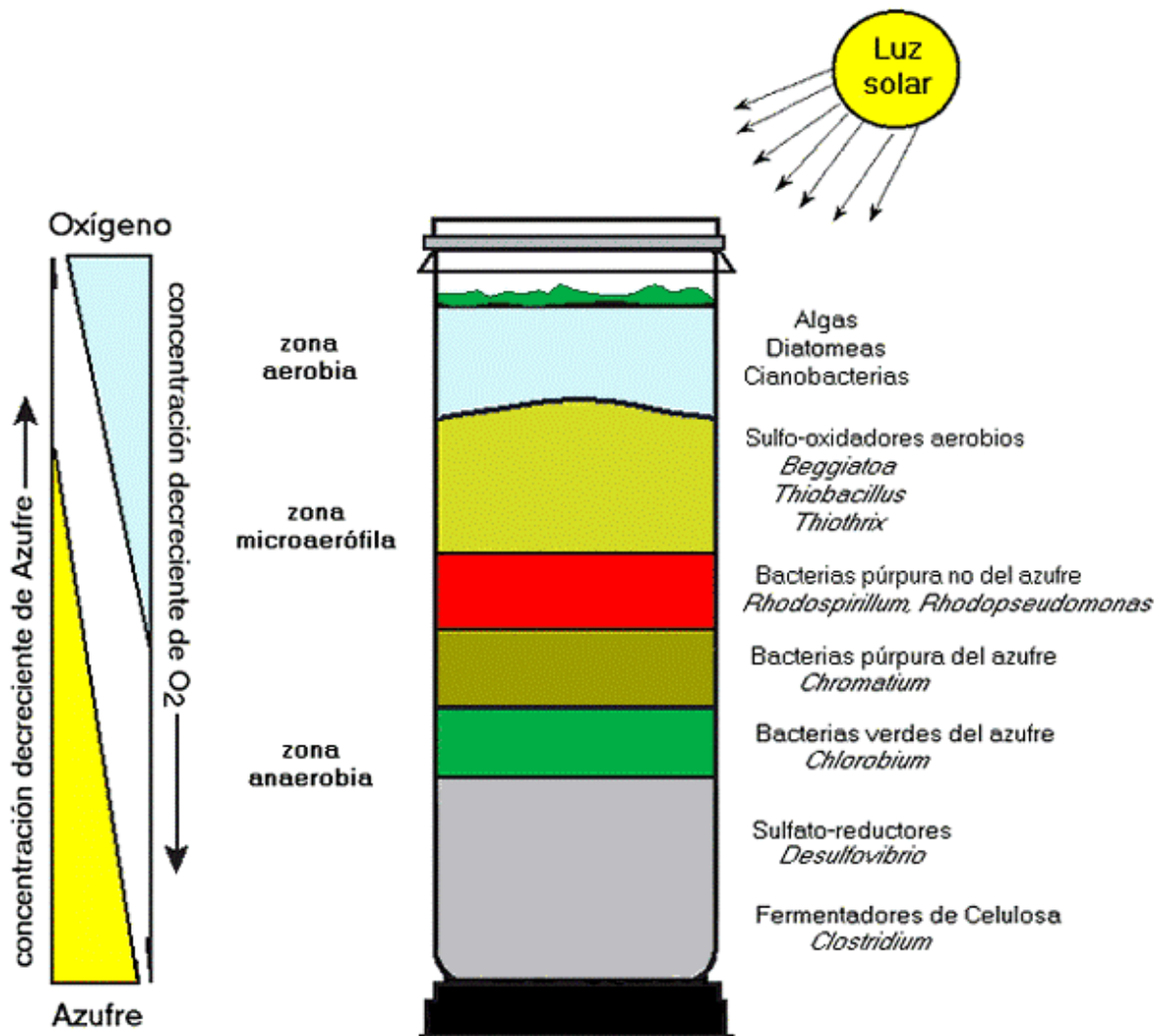
Género de los microorganismos que son objeto del estudio y su participación en la transformación del S<sup>0</sup>:

- *Desulfovibrio*: Bacteria reductora de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Anaerobia obligada. Productora de H<sub>2</sub>S a partir del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> mediante respiración.
- *Desulfotomaculum*: Bacteria esporogena reductora del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Anaerobia obligada. Productora de H<sub>2</sub>S a partir del SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> mediante respiración.
- *Chromatium*: Bacteria púrpura del S. Anaerobia obligada y fotodependiente. Oxida H<sub>2</sub>S a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mediante el proceso de fotosíntesis.
- *Chlorobium*: Bacteria verde del S. Anaerobia obligada y fotodependiente. Oxida H<sub>2</sub>S a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mediante el proceso de fotosíntesis.
- *Rhodospirillum*: Bacteria púrpura no del S. Anaerobia, microaerofila o aeróbica. Utiliza compuestos orgánicos tanto para efectuar un proceso fotosintético en ausencia de O<sub>2</sub>, como para efectuar un mecanismo respiratorio en presencia de éste. Puede utilizar fotosintéticamente bajas concentraciones de H<sub>2</sub>S pasándolo a SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, sin dar como intermediario al S<sup>0</sup>.
- *Chloroflexus*: Bacteria verde no del S. Descubierta recientemente, se asemeja por sus propiedades metabólicas y nutricionales a las rojas no sulfúreas.
- *Beggiatoa*: Bacteria deslizante oxidadora del H<sub>2</sub>S. Aeróbica o microaerófila. Oxida H<sub>2</sub>S a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con producción de S<sup>0</sup> como intermediario mediante metabolismo respiratorio.
- *Thiothrix*: Bacteria no deslizante oxidadora del H<sub>2</sub>S. Aeróbica o microaerofila. Oxida H<sub>2</sub>S a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con producción de S<sup>0</sup> como intermediario mediante metabolismo respiratorio.
- *Thiobacillus*: Bacteria oxidadora del H<sub>2</sub>S y otros compuestos del S. Aeróbica. El producto final de la oxidación es el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, obtenido mediante metabolismo respiratorio. No acumulan S<sup>0</sup> en su interior.

Todos los géneros mencionados pertenecen a una de las divisiones de Reino: Procariotas, que es la división II: Bacterias. Es preciso también el estudio del único miembro de la división I: Cianobacterias, ya que el mismo participa también en el ciclo del S.

- Cianoficea, Cianobacteria o Alga verde azul: organismo aeróbico y fotodependiente. Utiliza agua o H<sub>2</sub>S para su mecanismo fotosintético.

La columna aquí descrita se enfoca sobre todo al ciclo del azufre, pero se podría desarrollar igualmente la reproducción de otros ciclos biogeoquímicos equivalentes para nitrógeno, carbono y otros elementos.



### Consideraciones

Los “mecanismos adaptativos de la vida de relación” son quienes permiten, ante cambios en la presión selectiva del ambiente, variar las relaciones existentes entre los miembros del nicho ecológico. De esta manera, los grupos microbianos poseen un rasgo bioquímico esencial. Sin embargo, éste casi nunca es único.

Así, por ejemplo, un fotosintético cabal como el alga verde azul, que siempre es descrito como un fotótrofo estricto, en algunos casos, puede crecer en la oscuridad respirando aeróbicamente ciertos azúcares simples como la glucosa.

También en Chromatium, género definido siempre como fotodependiente obligado, exhibe un mecanismo de obtención de energía de mantenimiento, mediante respiración anaerobia endógena del glucógeno almacenado.

A estas “realidades” no muy estudiadas, se suman algunos géneros que presentan tal diversidad, que no permiten ser ubicados con un único rasgo bioquímico. Este es el caso de Rhodospirillum y Choroflexus, que no tienen una ubicación estanca, y que pueden desarrollarse como fotolitótrofos, fotoorganótrofos, y quimioorganótrofos.

Este rango de variabilidad también se repite en algunos organismos como Beggiatoa y Thiobacillus, que pueden crecer en condiciones estrictamente autotróficas, y otros del mismo género, en condiciones estrictamente heterótrofas.

El género Desulfovibrio que se describe como un quimioorganótrofo obligado que obtiene su energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos, es en algunos casos un consumidor de H<sub>2</sub>, que pasa a ser su fuente inorgánica de energía.

Es así, como luego de estas consideraciones, nos permitimos releer con otra dimensión la primera frase de esta guía, en la cual quisimos transmitir que todo fenómeno biológico debe ser abordado desde un punto de vista dinámico, ya que como habíamos expresado, el fenómeno VIDA es dinámico en sí.

## Comportamiento bacteriano comunitario

### Biocapas o Biofilms

La flexibilidad en la expresión génica bacteriana permite la supervivencia en ambientes sometidos a condiciones cambiantes, y las bacterias, siendo especialmente adaptables, han podido colonizar casi todos los nichos de nuestro planeta. Un ejemplo relevante de esta adaptación es la habilidad de formar biofilms. Los biofilms son depósitos no estructurados de células y de glucocálix acumulado, compuesto por sustancias poliméricas extracelulares, con capacidad para adherirse a diversos materiales o tejidos.

La presencia de biofilms es ubicua en la naturaleza: limo o película que aparece en las estructuras en contacto con el agua (tuberías, plantas de tratamiento de aguas, etc). Se reconoce en la actualidad que la formación de biofilms constituye un importante aspecto no solo de muchas, sino de la mayoría de las enfermedades bacterianas incluyendo endocarditis, osteomielitis, caries dental, infecciones del oído medio, infecciones asociadas a

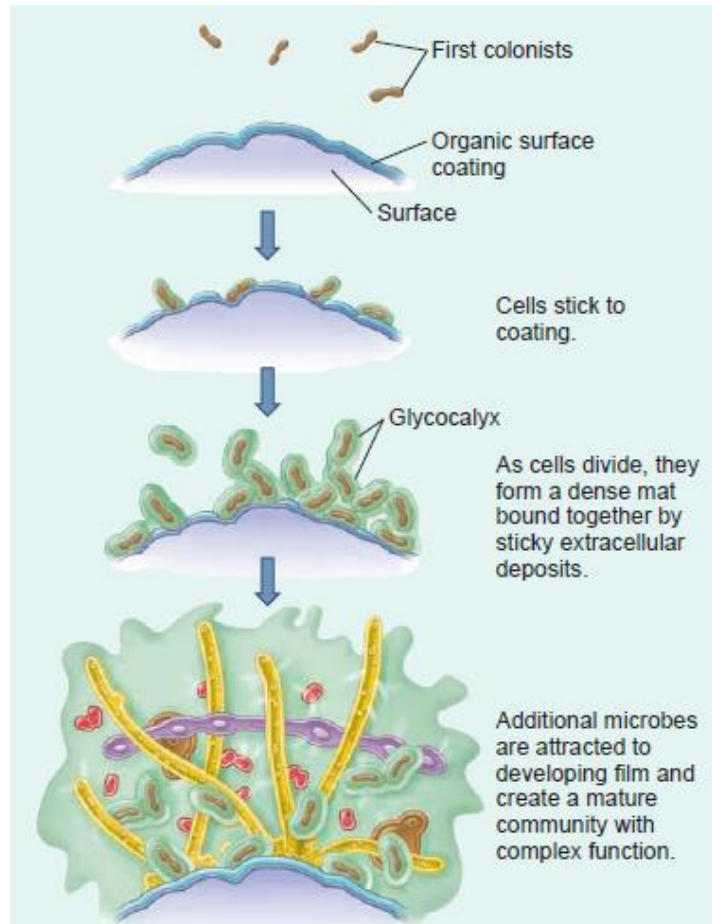
instrumentos médicos, infecciones de implantes oculares e infecciones crónicas en pulmones en pacientes con fibrosis quística, etc. Los habitantes de los biofilms son heterogéneos, los relacionados con enfermedades pueden ser multi-especie o incluso multi-reino (biofilms involucrados en caries dentales), o única especie como los en la endocarditis. Pero incluso las bacterias formadoras de biofilms única especie, son heterogéneas en su expresión génica. Esto es debido a las limitaciones de difusión impartidas por el biofilm, que resultan en variaciones locales de pH, nutrientes y oxígeno, así como de distintas concentraciones de metabolitos bacterianos.

Los humanos hemos dado uso beneficioso a la formación de biofilms, sobre todo en el área de remediación de hábitat. Por ejemplo, las plantas de tratamiento de aguas reducen la cantidad de bacterias, patógenos y material orgánico a través de bacterias formadoras de biofilms.

### ¿Por qué las bacterias forman biofilms?

1- Defensa: respuesta al estrés.

Los biofilms pueden resistir fuerzas físicas tales como el flujo sanguíneo o la acción lavadora de la saliva. Los biofilms pueden tolerar agentes antimicrobianos en concentraciones 10-1000 veces mayores que las necesarias para matar bacterias planctónicas (de vida libre) genéticamente equivalentes, y son también extraordinariamente resistentes a fagocitosis al interferir en el



recubrimiento de anticuerpos y bloquear así la opsonización. Todo esto hace a las bacterias formadoras de biofilms sean extremadamente difíciles de erradicar de huéspedes vivos.

La invulnerabilidad de los biofilms probablemente dependa de características específicas como son el crecimiento lento y la heterogeneidad fisiológica de sus habitantes. Los biofilms ven aumentada su resistencia por el complejo polímero extracelular que lo compone y que constituye una barrera de difusión.

2- Colonización: mecanismo para permanecer en un nicho favorable.

El cuerpo, o al menos partes de él, es rico en nutrientes y relativamente estable con respecto al contenido de agua, oxígeno y temperatura. La motivación para el cambio de crecimiento bacteriano al modo biofilm puede ser el de permanecer fijo. Este concepto se aplica a otros nichos ecológicos. Cuando las fuentes de nutrientes son escasas, las bacterias se liberan del biofilm, retomando el crecimiento planctónico en busca de mejores hábitats.

3- Comunidad: biofilms y comportamiento comunitario.

Los miembros de biofilms mixtos tienen diferentes requerimientos y llevan a cabo diferentes funciones metabólicas haciendo el comensalismo un fenómeno ampliamente diseminado, ej.: especies consumidoras de oxígeno crean un ambiente favorable para los anaerobios obligados. Los distintos miembros del biofilm se comunican a través de pequeñas moléculas señales difusibles: autoinductores, péptidos estimuladores de competencia, etc.

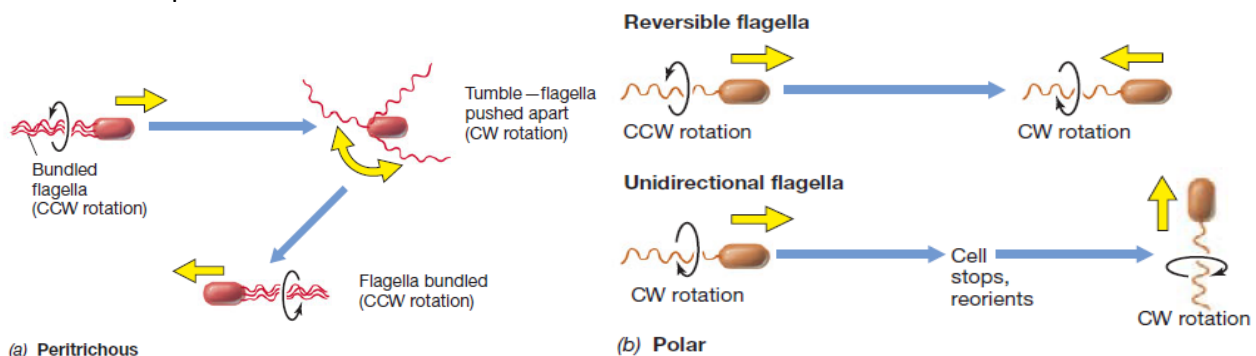
Un biofilm es el ambiente ideal para la transferencia horizontal de material genético. La proximidad favorece la diseminación de fagos, así como también los procesos de conjugación y toma de plásmidos por bacterias competentes.

4- Biofilms como modo de crecimiento, "salvaje".

Muchas bacterias pasan la mayoría de su existencia natural creciendo como biofilms, y sin embargo en condiciones de laboratorio "cultivadas" crecen planctónicamente.

## Swimming

Bacterias flageladas pueden realizar algunas proezas como detectar y moverse en respuesta a señales químicas, un tipo de comportamiento llamado quimiotaxis. La quimiotaxis positiva es el movimiento de una célula en la dirección de un estímulo químico favorable (por lo general un nutriente); la quimiotaxis negativa es el alejamiento de un compuesto repelente (potencialmente peligroso). El flagelo puede guiar las bacterias en una cierta dirección, porque el sistema de detección para los productos químicos está vinculado a los mecanismos que impulsan el flagelo. El sistema de detección se encuentra situado en la membrana celular y son grupos de receptores que se unen a moléculas específicas procedentes del entorno inmediato. La unión de un número suficiente de estas moléculas transmite señales al flagelo y lo establece en movimiento rotativo en sentido horario o antihorario. Esto es un movimiento de la bacteria en sí y no está coordinado con el resto de la población.



## Swarming

Swarming involucra la diferenciación de células vegetativas en células hiperflageladas que llevan a cabo la migración rápida y coordinada de la **población** a través de superficies sólidas.

El swarming bacteriano es un movimiento dirigido por flagelos en presencia de limo (slime) extracelular (mezcla de carbohidratos, proteínas, péptidos, surfactantes, etc.) por el cual las bacterias se pueden diseminar como un biofilm sobre una superficie. Este proceso se da en miembros de los géneros *Proteus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, etc.

En contraste con el “nado”, donde las bacterias se mueven individualmente a través de canales de agua en agar (0,2-0,4%), el swarming es un fenómeno **social** a través del agar (0,4-1,2% agar). Estas células se movilizan en grupos o rafts, organizadas paralelamente a su eje mayor para maximizar los contactos célula-célula, colonizando toda la superficie disponible. El frente de migración es precedido por una capa visible de material extracelular similar al limo.

Los biosurfactantes glicolipídicos o lipopeptídicos como los ramnolípidos (*Pseudomonas*), surfactina (*Bacillus*) y serrawetina (*Serratia*) funcionan como agentes “humectantes” mediante la reducción de la tensión superficial.

El swarming tiene una naturaleza “social” indicando que señales extracelulares y célula-célula son estímulos centrales.



### Formación de cuerpos fructíferos.

Los biofilms y los cuerpos fructíferos tienen dos rasgos en común: 1) se forman en superficies sólidas en respuesta a señales externas e internas; 2) en ambas estructuras las células están embebidas en exopolisacáridos. A pesar de estas similitudes, el mecanismo de su formación es diferente. La formación de cuerpos fructíferos depende de movimientos celulares organizados y regulados tanto espacial como temporalmente.

Veamos como ejemplo el caso de *Myxococcus xanthus*:

*M. xanthus* exhibe dos tipos de movimientos. En presencia de gran cantidad de nutrientes, las células realizan movimiento llamado aventurero (A) y colonizan nuevas áreas. Este movimiento aventurero se realiza a expensas de polisacáridos que produce y complejos de adhesión focal. Cuando la densidad celular es alta Movimiento social (S) y las células sufren ayuno las células migran movimiento hacia los centros de agregación mediante un movimiento mal llamado “swarming” porque no depende de flagelos, el movimiento es mediado por pilis Tipo IV, es un tipo de gliding. Inicialmente, estos centros son pequeños y asimétricos, pero a medida que más células se acumulan a lo largo del tiempo, se forman “colinas” hemiesféricas de hasta  $10^5$  células. Dentro de estas colinas, las células se diferencian en esporas no móviles, resultando en la formación de cuerpos fructíferos maduros. “Rippling” o formación de olas, es el movimiento que precede y se superpone con el estadio de agregación de cuerpos fructíferos. Durante este movimiento conocido como “rippling”, las células se organizan es estructuras que parecen canaletas o arrugas, que se mueven rítmicamente en un patrón que asemeja olas. Las ripples son estructuras multicelulares, dinámicas y transitorias.

