

TEMA-1 INTRODUCCIÓN

1 DESARROLLO HISTÓRICO.

–La microbiología es la ciencia que estudia los microorganismos, y un microorganismo o germen es un ser vivo diminuto y para verlo se necesita un microscopio.

–Las acciones perjudiciales de un microorganismo pueden ser las enfermedades, que son producidas por un agente patógeno, pero los agentes patógenos solo son un pequeño porcentaje de todos los microorganismos y son muchos mas los que producen efectos beneficiosos.

–Entre las acciones beneficiosas que estos producen se puede dar el ejemplo de los protozoos marinos los cuales son el primer eslabón de la cadena alimenticia de algunos ecosistema acuáticos, otro ejemplo también podría ser el de algunas bacterias que se encuentran en nuestro organismo, las cuales son las responsables de la síntesis de la vitamina B que actúa en el metabolismo o de la vitamina K la cual interviene en la coagulación. También encontramos microorganismos en el suelo los cuales son los responsables de la transformación de materia inorgánica en orgánica, otros realizan la fotosíntesis. Y otros son utilizados en la industria de los alimentos para producir fermentaciones.

–los microorganismos se pueden clasificar en 5 grupos:

- 1.Bacterias las cuales son las más numerosas.
- 2.Hongos que se subdividen en:

A. Mohos que son pluricelulares.

B. Levaduras que son unicelulares.

- 3.Protozoos.
- 4.Algas.
- 5.Virus que son los de menor tamaño

–La microbiología nace con la invención del microscopio en 1610 que se le atribuye a Galileo, pero el primero en observar una célula fue Hooke en 1664, y ya en 1674 Leeuwenhoek fue el primero en observar un bacilo.

–Antes de creer en la microbiología se creía en la teoría de la generación espontánea la cual decía que todo salía a partir de la materia inerte y en contra de esto apareció la teoría de la biogénesis que dice que un ser vivo solo puede preceder de otra célula viva preexistente.

–El próximo hombre importante en la historia de la microbiología es el francés Pasteur el que demostró que los microorganismos eran quienes contaminaban los diferentes medios. Esto coincidió con la edad de oro de la microbiología cuyo periodo comprende desde 1861 hasta 1914, la mayoría de los acontecimientos de esta época se deben a 2 grandes escuelas la francesa encabezada por Pasteur y la alemana en la cual destaca el nombre de Kock, en esta época se mejoraron los microscopios y se evoluciono mucho

ACONTECIMIENTOS IMPORTANTES:

–En 1861 Pasteur demostró que los microorganismos producían la alteración de alimentos y descubrió la pasterización que consiste en aplicarle a un líquido durante un periodo de 30 minutos una temperatura de 65

grados.

–En 1865 se descubrió la teoría infecciosa de las enfermedades, es decir, se demostró que las enfermedades están producidas por microorganismos este descubrimiento también se le debe a Pasteur.

–En 1876 el alemán Kock descubrió que una bacteria causaba una cierta enfermedad e ideó los medios de cultivo. Descubrió el agente causante de la tuberculosis.

–En 1880 Pasteur descubrió el fundamento de las vacunas mediante la inyección de bacterias viejas, las cuales, habían perdido la capacidad de producir la enfermedad pero en cambio inducían a la inmunidad frente a los ataques de bacterias jóvenes. Se conoce como vacunación debido a que en 1800 Jenner fue el primero en aplicarla y descubrió que las personas que ordeñaban las vacas eran inmunes a una enfermedad y él cogía raspados de vacas muertas para inocular a la gente.

–Después de todos estos acontecimientos la quimioterapia que nace alrededor de 1890 fue una técnica muy utilizada; esta técnica consistía en la busca de sustancias químicas para destruir a diversos microorganismos.

Esta técnica se puede dividir a su vez en 2 técnicas más:

1.La química de síntesis en la cual se probaba una bacteria con una sustancia sintetizada.

–En 1910 se descubrió el Salvarsan efectivo contra la sífilis.

–En 1930 se descubren las sulfamidas.

2.La natural la cual utiliza agentes químicos naturales como son los antibióticos.

–En 1928 se descubre la penicilina, este descubrimiento fue casual.

EDAD MODERNA

Cabe destacar como precursor la invención del microscopio electrónico en 1940.

–En 1940 Florey, Chain y Fleming consiguen sintetizar la penicilina en forma cristalina, por este trabajo recibieron en 1945 el premio Nobel.

–En 1960 se descubre el interferón que puede inhibir la replicación de algunos virus el interferón está en nuestro propio organismo.

–En esta época nace la virología que es la ciencia dedicada al estudio de los virus. El primer virus fue descubierto por Dimitri Iwanoski y fue el del polio del tabaco.

EDAD ACTUAL

Nace la tecnología del ADN recombinante y surgen 2 ramas la genética y la biología molecular.

–1944 McLeod, McCarty y Avery descubren que el ADN es el material genético de las bacterias.

–1953 Watson y Crick descubren la estructura del ADN y cómo se replica.

Estos dos hechos abrieron el camino de la denominación de ADN recombinante, que es la unión de fragmentos de ADN (genes) de origen vegetal o animal que son unidos a otros genes bacterianos, entonces

este ADN recibe el nombre de ADNhibrido. El cual se le introduce a la bacteria y esta lo toma como propio y empieza a sintetizar las proteínas ordenadas.

2. CLASIFICACIÓN DE LOS SERES VIVOS.

–Linneo fue el primer taxónomo que clasifico a los seres vivos, y el lo hizo en 2 grandes grupos el reino de los animales y el reino de las plantas, esta clasificación data del siglo XVIII.

–En el XIX Haeckel dijo que eran 3 los reinos: el animal, el vegetal y el protista que estaba formado por bacterias, hongos, protozoos y algas.

–En 1970 Whitaker añadió 2 reinos mas y los clasifico en reino plantae, animalia, protocista, algae y monera.

–Y en 1980 Woese secuencio el ARN ribosómico que participa en la síntesis de las proteínas y concluyó en que solo existían 3 reinos que son Archaea, bacteria y eukarya. El Archaea formado por raras bacterias como las metanógenas que producen CH₄ olas acidotermofilas y sulfurosas. En los eukarya incluyo algas, animales, protozoos, hongos, debido a que tenemos similar molécula de ARN ribosómico.

3. RELACIONES EVOLUTIVAS

–No hay un acuerdo claro sobre el origen de la vida pero si se sabe que hubo un organismo llamado antepasado común y evolucionamos los 3 reinos a partir de el, animales y plantas que son macroorganismos evolucionaron a partir de algas, hongos y protozoos. La diferencia es que Archae y Bacteriae son procariotas.

MIRAR DIFERENCIAS ENTRE CÉLULA EUCARIOTA Y PROCARIOTA.

TEMA-2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA CÉLULA PROCARIÓTICA.

1. MORFOLOGÍA, DISPOSICIÓN Y TAMAÑO DE LOS MICROORGANISMOS.

• MORFOLOGÍA:

La forma de las bacterias es muy variada, en general se pueden dividir en 3 tipos:

- Esféricas: pueden ser una esfera perfecta, achatada por los polos o achatada por los planos, reciben el nombre de **cocos**.
- Bastones: son mas o menos alargados y reciben el nombre de **bacilos**. Dentro de ellos se pueden realizar otras subdivisiones.
- Vibrios; bacterias acuáticas con forma de coma ejemplo *Vibrio Cholerae* (colera).
- Esperilo.
- Espiroquitas; muchas espirales; ejemplo *Treponema pallidum* causante de la sífilis.
- Cocobacilos: forma de coco y bacilo
- Otras formas podrían ser la de estrella y en cuadrado.
-

B. FORMA DE DISPOSICIÓN BACTERIANA:

La célula madre se alarga después se duplica su ADN, sigue alargándose longitudinalmente. Una célula hija se va a un polo de la célula. En el centro se forma el septo transversal, una barrera que divide a 2 células hijas que pueden separarse o quedarse juntas.

DISPOSICIÓN DE LOS COCOS

- Si la célula se divide por un plano 2 veces es **diplococo** como p.ej. *Streptococcus pneumoniae*.
- Si la célula se divide en un plano varias veces se forma un estreptococo, forman cocos en cadenas
- Si la célula se divide por 2 planos se forman 4 cocos (tétrada)
- Si la célula se divide por 3 planos regulares se forman 8 cocos, formando un cubo (sarcina)
- Si la célula se divide por 3 planos irregulares se forma un cocos en forma de racimo (estafilococo), p.ej. *Staphylococcus aureus*.

DISPOSICIÓN DE LOS BACILOS:

Los bacilos se pueden clasificar por su disposición de la siguiente manera:

- Cuando forman cadenas en forma de empalizada (acordeón) p.ej. *Corynebacterium diphteriae*.
- Cuando los bacilos se disponen en forma de cadenas (estreptobacilos) p.ej. *Bacillus cereus*.

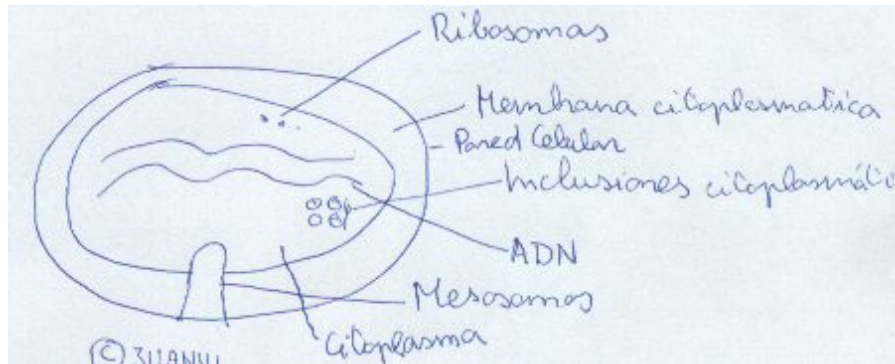
C. TAMAÑO DE LAS BACTERIAS.

- Cocos Van de 0,25 μ m a 3 μ m de diámetro, pero su diámetro medio es de 1 μ m
- Bacilos: Altura de 0,25 a 8 μ m, pero su media es de 1 μ m. Su anchura va desde 1 μ m hasta 50 μ m, su media es de 2 μ m.
- Espermatozo (bacilo curvado) tiene una altura de 1 μ m de media y una anchura de 5 μ m de media.

El bacilo es visible a simple vista y es la única bacteria descubierta hasta el momento que se ve a simple vista es el *Thiomargarita namibiensis* que no es patógeno tiene unas medidas de 100 μ m de alto por 700 μ m de ancho.

Otros ejemplos podrían ser *Oscillatoria* 8x50 μ m el *Bacillus megaterium* 1,5x4 μ m o *E. Coli* 1x3 μ m.

ESTRUCTURAS DE LAS CÉLULAS DE LAS BACTERIAS.



Las inclusiones citoplasmáticas pueden ser de diversos tipos:

- Gránulos de azufre
- Gránulos de PHB
- Gránulos de polifosfatos
- Gránulos de glicógeno
- Gránulos de almidón
- Vacuolas de gas.

Los orgánulos exteriores pueden ser

- Cápsulas (no todas tienen)
- Cilios y flagelos en un extremo de la célula.
- Fimbrios o pelos solo en algunas bacterias.

La cápsula es una capa mucilaginosa (viscosa, pegajosa) formada por polisacáridos unidos entre si, también puede estar formada por polipéptidos, e incluso por una mezcla de ambos.

Sus funciones son:

- Almacén de reserva de nutrientes como (como despensa para las bacterias)
- Lugar de desecho de nutrientes para otras bacterias.
- Causan enfermedad si tienen cápsula este es su factor de virulencia.
- Los fagocitos que son leucocitos, engloban la bacteria por fagocitosis y la digieren
- Gracias a la cápsula se fijan a superficies sólidas para poder sobrevivir.

Para poder determinar la presencia de la cápsula en las bacterias hay que hacer una tinción negativa (en lugar de ver en color vemos en blanco). En la tinción de usa tinta china o india; de color rosa también se puede utilizar violeta de cristal.

PARED CELULAR

Estructura sumergida. Su función es la de dar forma y consistencia a la bacteria.

La bacteria en medio natural esta en medio liquido, regula la osmosis permitiendo el paso o la salida de sustancias dependiendo de la diferencia de concentración entre el medio interno y el externo mediante la **osmosis**.

Su grosor depende de la bacteria. Va de 10 a 25 m, la media es de 15 m.

La pared celular no es igual en todas las bacterias, y esto fue descubierto en 1884 por H.C.Gram, observando que unas se teñían de rojo y otras de violeta. Así se clasificaron en Gram⁻ y en Gram⁺, las cuales son químicamente distintas.

Las Gram⁺ tienen un 90% de péptido glicano y un 10% de ácidos teicoicos. Principales antígenos.

Las Gram⁻ no tienen ácidos teicoicos y están formadas por una membrana externa compuesta por liposacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos, y también un 10% de péptido glicano.

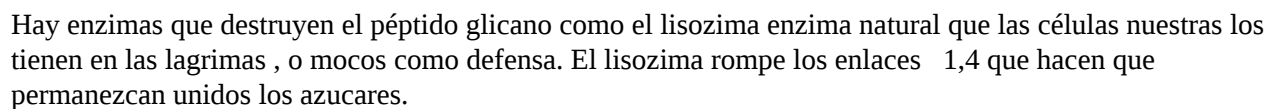
Esta ultima capa es una barrera contra agentes como la penicilina y lisozima, porque para destruirla hay que destruir el EDTA presente en las porinas.

también es una barrera contra metales tóxicos, desinfectantes y contra los fagocitos.

Constituye una membrana de circulación de nutrientes (semipermeables), los nutrientes entran a través de los canales huecos de las porinas, que son inespecíficas y cualquiera que sea de pequeño tamaño entrara.



Es un mucopolisacarido formado por cadenas repetidas de un disacárido al que se le unen una cadena de tetrapeptidos formando una estructura tridimensional o de andamio. Los azucares son el N-acetil Glucosamina G y el ácido N-acetil muramico M



6

La lisozima destruye a la célula madre y a las células hijas, en cambio la penicilina no puede destruir a la célula madre pero si a las hijas.

RESISTENCIA

–La resistencia en las + es baja, y en las – es alta, pero si se habla de resistencia a la rotura física, las + son mas resistentes que las–, debido a su espesor.

La lisis es la rotura de la pared celular y la posterior explosión, debido a la falta de esta por osmosis en un medio hipotónico.

En un medio hipertónico todo el contenido intracelular sale fuera y aparece una bacteria sin pared celular, y sus trozos de pared.

En la naturaleza solo existe un genero de bacterias sin pared celular el *Mycoplasma*, todas las demás tienen pared.

TEMA-3 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA CÉLULA PROCARIOTA II

1.MEMBRANA CITOPLASMÁTICA

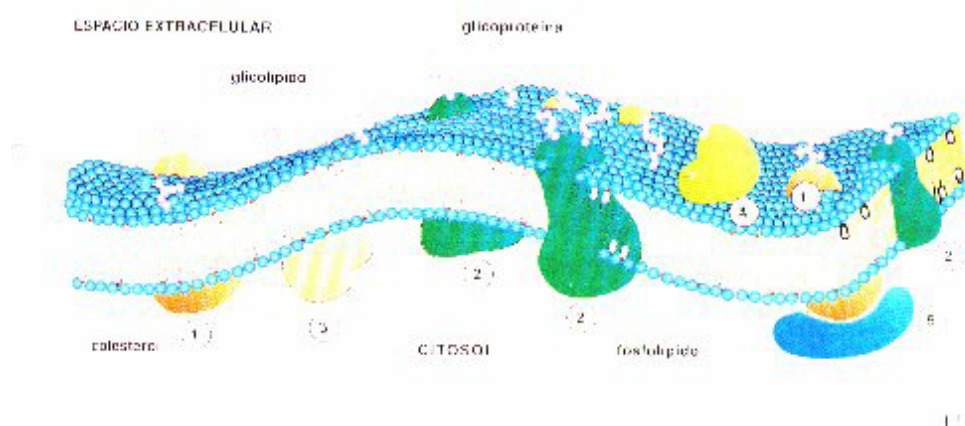
Es una membrana muy flexible y su espesor es de aproximadamente la mitad de la pared celular unos 8 micrómetros, esta compuesta por un 60% de fosfolípidos y un 40% de proteínas.

La forman 2 capas de fosfolípidos (bicapa fosfolipídica). Un fosfolípido esta compuesto por una parte polar y una parte apolar, la parte polar es el glicerol y es la parte hidrófila, la parte del lípido es apolar y es hidrófoba .

La bicapa esta formada por 2 filas paralelas, en las cuales se unen las cabezas polares hacia fuera y las colas hacia dentro. También tienen proteínas que pueden ser de 2 tipos integrales (atraviesan la membrana, y reciben el nombre de transportadoras) y estructurales que se encuentran en la superficie.

La membrana es muy flexible, fluida y recibe el nombre de mosaico de fluido.

La membrana se puede destruir mediante polimixina



FUNCIONES DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La membrana constituye una barrera semipermeable selectiva de nutrientes. Las moléculas pequeñas entran fácilmente y reciben el nombre de transporte pasivo (moléculas pequeñas, iones, agua...) a favor de gradiente

de concentración.

Activamente una célula introduce un nutriente en contra de gradiente de concentración consumiendo ATP. Para ello la proteína cambia de conformación.

Hay 3 tipos de proteínas transportadoras; la que introduce un nutriente de exterior al interior o viceversa recibe el nombre de uniportadora, la que introduce o secreta 2 nutrientes a la vez recibe el nombre de simportadora y por ultimo las antiportadoras que permiten a la vez el paso de nutrientes uno al exterior y el otro al interior.

Otra función seria la de situar los citocromos, que son componentes de la cadena de e⁻ intracelular mediante la cual se genera ATP. Pues están en la membrana plasmática.

También se localizan en ella los cromatoforos, que son unos gránulos de reserva de pigmentos y enzimas fotosintéticos (están en las membranas de bacterias fotosintéticas p.ej. en las Cianobacterias)

DIFERENCIAS ENTRE LA MEMBRANA DE BACTERIAS Y UNA EUCARIOTA.

La diferencia esta en que las eucariotas hay esteroides los cuales dan rigidez a la membrana, la presencia de esteroides en las bacterias solo se da en las Micoplasmas.

2. MESOSOMAS

Son unos plegamientos, los cuales no se sabe exactamente cual es su función y hay diversas teorías:

- Una de las teorías dice que los mesosomas aparecen al reproducirse la bacteria y creen que tiene que ver con la formación del septo transversal y la separación de las 2 copias del ADN.
- Otros dicen que serian un lugar de almacenamiento de nutrientes
- Otros que segregan enzimas al exterior
- Y la que se piensa que es mas cierta, es la que piensa que los mesosomas son artefactos que surgen al realizar las preparaciones en el microscopio, y no sirven para nada.

CITOPLASMA

Es la parte de la célula que se extiende en el interior de la membrana citoplasmática, es semitransparente, espesa y bastante elástica.

Tiene aspecto granuloso y esta compuesta por un 80% de agua y el resto son azúcares, lípidos, proteínas, iones orgánicos...

Su función es la de alojar estructuras como los ribosomas, ADN, gránulos de reserva de materiales como las inclusiones.

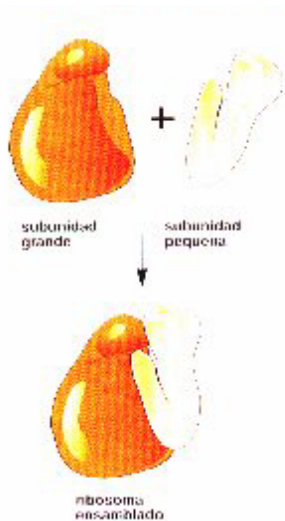
RIBOSOMAS

En los procariotas son 70S, y esta formado por 2 subunidades un 50S y la otra 30S. La S viene de Svedberg e indica la velocidad relativa con la que los ribosomas son centrifugados a velocidades ultrarrápidas.

están compuestos por un 60% de proteínas específicas y un 40% de ARNRIBOSÓMICO.

Las 50S están formadas por 2 moléculas de ARNRIBOSÓMICO, la mas grande es 23S y la pequeña es 5S, también esta compuesto por 35 proteínas específicas.

Las 30S están formadas por 1 molécula de ARN ribosómico que es 16S y 20 proteínas específicas.



Su función es la de sintetizar las proteínas.

Los agentes microbianos que actúan a nivel de ribosomas son los tetraciclinos, estreptomicina, y neomicina, los cuales impiden el acoplamiento de las 2 unidades de ribosomas por lo tanto inhiben la síntesis de proteínas.

REGION NUCLEAR (NUCLEOIDE)

En realidad no existe en procariotas, ya que no está delimitado por una membrana, y en este caso se refiere al ADN, también llamado cromosoma bacteriano solo hay un cromosoma en las bacterias.

Es una molécula iónica, larga, circular de ADN bicatenario.

El ADN contiene la información genética de la célula. Las 2 cadenas se ensamblan para formar una estructura de doble hélice. Las unidades de ADN son los nucleótidos y están se pueden dividir en 3 partes, 1 grupo fosfato, la desoxirribosa, y una base nitrogenada. Las bases son 4 adenina, guanina, timina y citosina.

La doble hélice se forma por la unión de fosfato-azúcar entre nucleótidos alternos. Esto sería el esqueleto azucarado del ADN.

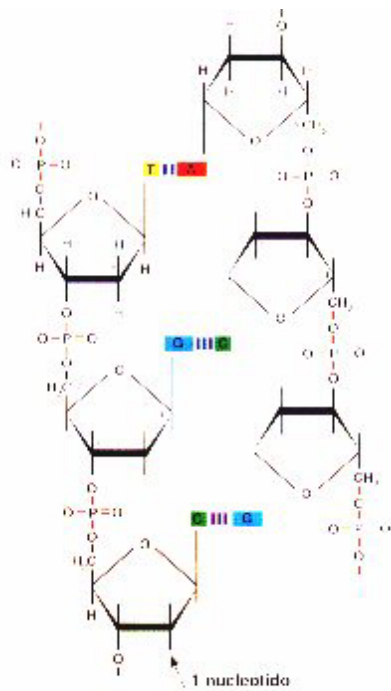
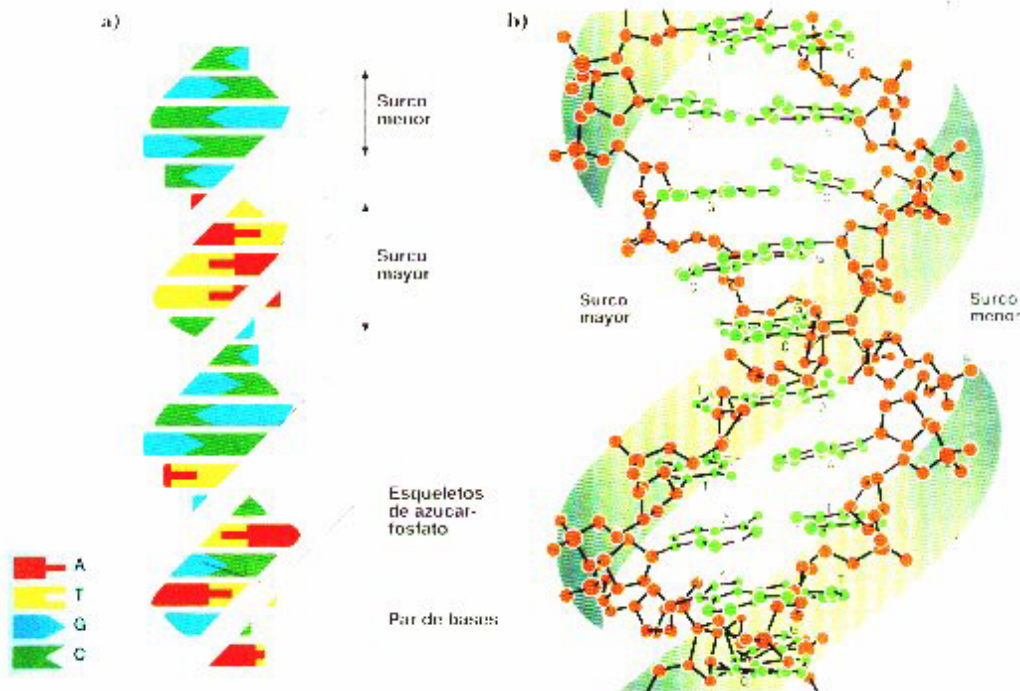


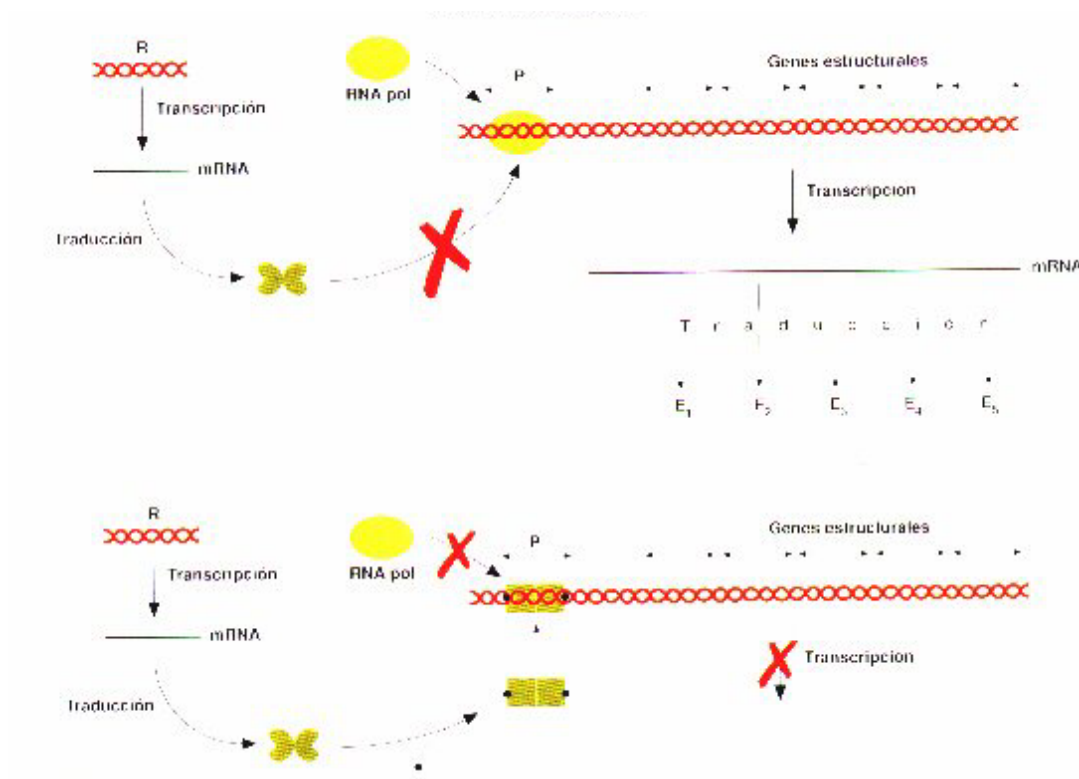
Fig. 13. Representación esquemática de la disposición en antiparalelo de los dos cadenas de la molécula de DNA.

Los enlaces entre las bases son específico A-T G-C.

Esta estructura esta retorcida formando una escalera de caracol, donde la barandilla serian los fosfatos y azucars, y los peldaños serian los nucleótidos.



Su función es la de contener la información genética en 1 gen hay de 1000 a 2000 nucleótidos.



Los agentes microbianos que actúan pueden ser la luz ultravioleta impidiendo la copia de la molécula de ADN.

Un plasmido es una molécula de ADN bicatenaria de menor tamaño posee entre 50 y 100 genes. Se replica independientemente del cromosoma principal y tiene la función de poseer los genes que codifican la resistencia a antibióticos, toxinas o metales pesados mediante la conjugación bacteriana.

INCLUSIONES CITOPASMÁTICAS

Son gránulos de reserva orgánica o inorgánicos, que están incrustados en el citoplasma.

ORGÁNICOS

- PHB son depósitos de grasa de PHB (es un polímero de ácido poli- β -hidroxi-butirato, formado por ácido poli- β -hidroxi-butírico) hasta 60 moléculas se unen para formarlo en enlace tipo éster. Su función es la de ser fuente de reserva de C y energía para la célula, por lo tanto en condiciones normales no se les utiliza. SE tiñen con Negro Sudan.
- gránulos de almidón o glicógeno: Son granos de reserva de azúcares se utilizan también como reserva de C y fuente de ATP, estos se observan tiñéndolos con yodo.

INORGÁNICOS

- Polifosfatos: son gránulos de volutina o metacromáticos, que son reservas de fosfatos inorgánicos, por lo tanto son una fuente de energía ya que, los P_i son utilizados en la síntesis del ATP.
- gránulos de S los utilizan los *Chlorobacillus* que oxidan el S para obtener energía. Su función es la de ser una fuente de energía.
- Vacuolas de gas, no se pueden considerar inorgánicos ni orgánicos. Son unas cavidades huecas que tienen las bacterias acuáticas, formadas por varias filas de vesículas gaseosas, que son cilindros huecos revestidos de proteína. Su función es la de mantener la flotabilidad de las bacterias acuáticas,

permanecer a la profundidad adecuada para tomar oxígeno, nutrientes y luz.

TEMA-4 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA CÉLULA PROCARIOTA III.

LOS FLAGELOS

Son apéndices filamentosos que poseen las bacterias acuáticas. Mediante estos se mueven, por lo tanto, su función es la de ser el aparato locomotor de las bacterias acuáticas. Son muy finos y largos y están anclados a la pared celular. Pueden llegar a medir hasta 20 veces la longitud de la célula. P. Ej. La *E. coli* mide 1 micrómetro y sus flagelos llegan a medir 20 micrómetros. Son visibles al microscopio electrónico y al óptico es difícil de verlos. Su tinción se realiza mediante la adición de AgNO_3 porque se concentra en las paredes del flagelo y lo hace un poco más gordo permitiendo su visión. El flagelo crece del ápice. Solo lo poseen las acuáticas y además algunas no acuáticas, pero muy pocas p.ej. *Proteus vulgaris*. Las bacterias se pueden clasificar por sus flagelos en:

- Atrica: No tienen flagelos
- Monotrica: Solo 1 flagelo p.ej. género *Campylobacter*.
- Anfitrica: 2 flagelos cada uno en un polo p.ej. género *Spirillum*.
- Lofotricas: 2 o más flagelos en un extremo o en las 2 p.ej. *Chromatium*
- Peritricas: Toda la superficie celular recubierta de flagelos p.ej. *Salmonella*.

Un flagelo se puede dividir en 3 partes:

- Filamento: Compuesto por una proteína llamada flagelina, formada por 8 subunidades de flagelina, esta hueco para permitir el crecimiento del filamento.
- Gancho: Que le dota de la capacidad de rotación, esta conectado al cuerpo basal.

3. Cuerpo basal: Formado por el eje central, proteínas y un sistema de anillos; este sistema es diferente en el caso de las GRAM- y las + las primeras tendrán 4 y las + 2.

Los anillos del cuerpo basal están anclados dependiendo de su posición, el más externo está en la capa más externa de las Gram- y recibe el nombre de L, el 2º es el P y está anclado al péptido glicano, por debajo están en la membrana citoplasmática el S y M. En las Gram+ ambos están anclados a la membrana citoplasmática y reciben los nombres de M y S.

Los responsables del movimiento son 2 proteínas. Al lado de los 2 anillos hay proteínas Mot, que son causantes del movimiento de los flagelos, y debajo del M hay una proteína llamada fli que es la conmutadora del movimiento (cambia el sentido del movimiento). La proteína Mot origina el movimiento haciendo que S y M se muevan y al estar conectados por un eje central hacen que se muevan el L y P arrastrando al gancho y por último al flagelo exterior.

Cuando la bacteria se mueve en una sola dirección recibe el nombre de movimiento en carrera, es típico de bacterias que poseen muchos flagelos.

Los que tienen pocos flagelos cambian de sentido realizando unos movimientos que son conocidos como tumbos y volteretas.

Las bacterias se mueven por estímulos que le vienen del medio exterior, los cuales son llamados taxis. Pueden ser tanto físicos como químicos; si es químico recibe el nombre de quimiotaxia y si es físico recibe el nombre de fototaxia. Las bacterias llegan hasta 50 micrómetros por segundo, siendo unas velocidades muy altas.

Otros movimientos serían por deslizamiento o reptación, pero estos no tienen flagelos.

El movimiento de las spiroquetas, que se mueven porque tienen unos filamentos axiales que reciben el nombre de axiostilos. Son unos filamentos que van de un extremo a otro, es contráctil y tienen capacidad de rotación, producen movimiento en carrera o dando tumbos.

PELOS O FIMBRIAS

Son estructuras filamentosas, son más cortos, más finos y más numerosos que los flagelos que rodean a la bacteria completamente, se llaman fimbrias o pelos, su función es la de ser aparatos de adhesión a superficies sólidas p.ej. *Neisseria garradaceae* o la salmonella que se adhiere al intestino así.

Estos pelos están formados por una proteína llamada pilina o vellosina y no crecen desde el extremo, si no desde la base. Otra diferencia es que al hacer un corte transversal de la pilina se ven 3 subunidades de pilina y un hueco, mientras en un flagelo se ven 8.

El pelo F está implicado en el mecanismo de la conjugación bacteriana. Este pelo es mucho más grueso y largo que un flagelo. La conjugación bacteriana es un proceso que está mediado por un plásmido. Se dice que una bacteria es F⁺ y tiene un plásmido que contiene a su vez un gen responsable de la síntesis del pelo, en las F⁻ o receptoras solo tienen el cromosoma principal no tienen plásmido, al transferírsele serán F⁺.

Para que se produzca tienen que haber contacto físico, activándose el gen y aparecen unas conjugaciones en la F⁺. La función del pelo es la de mantener el contacto. Es hueco porque a través de él pasa el plásmido. Una vez producida la transferencia el pelo se desenrolla y vuelve a su sitio acabando el proceso.

ENDOSPORA BACTERIANA.

La espora es una forma de latencia o resistencia que algunas GRAM⁺ forman en su interior, a consecuencia de las condiciones medioambientales adversas; es decir, una alta temperatura, la deshidratación o la falta de nutrientes. Cuando las condiciones son favorables se produce la germinación de la célula. Es decir, el paso de la célula vegetativa a espora es la esporagénesis que puede durar mucho tiempo y en condiciones favorables se realiza el proceso inverso la germinación. Algunas bacterias aerobias o anaerobias son capaces de realizar esto el *Clostridium tetano* el *Clostridium botulieum* (súper letal). Esto no es una forma de reproducción si no una herramienta para facilitar la supervivencia.

Las esporas son termoresistentes, muy resistentes a la falta de agua y también son muy resistentes a las radiaciones UV, también a los agentes químicos como antibióticos, desinfectantes, enzimas y detergentes. Hay un bacilo que da lugar a 5 esporas es el *Bacillus polispóra*. Según se la forma la disposición de las esporas las bacterias se pueden clasificar en:

- Esporas esféricas o redondas *Clostridium tetan*.
- Esporas ovoides *Bacillus cereus*.

Pueden disponer la espora en forma central, terminal (en un extremo) o subterminal (ni el extremo ni en el centro)

Normalmente la espora se forma en el interior, pero hay algunos bacilos que dan esporas más grandes de lo habitual, si se disponen en terminal y son redondas se les conoce como palillo de tambor. Si son ovoides y terminales deformantes son raquetas.

Mediante la tinción de esporas (2 colorantes) se ve de rosa la célula vegetativa y de verde la espora.

La composición de las espores es muy distinta a la de la célula vegetativa. En una espora hay un 60% de agua y en una célula 90% de agua. Una espora tiene muy pocos polisacáridos, menos que la vegetativa, pero posee + proteínas y grasas. Las proteínas + abundantes son las que tienen el aminoácido cisteína (puentes de disulfuro) el enlace es muy fuerte y es el responsable de la resistencia a la radiación solar. La espora tiene el 90% de enzimas que una vegetativa, pero están inertes, su actividad metabólica es casi nula. Tiene en su interior gran cantidad de iones Ca^{+} y tiene un compuesto que solo está presente en ellas es el ácido dipicolínico. La asociación de iones Ca^{+} y el ácido forma el dipicolinato que son largas cadenas muy resistentes a las T. La pared de la espora es muy gruesa, pero en el interior tiene su genoma completo, su ADN, moléculas de ARN, ribosomas, inclusiones citoplasmáticas. Su pared está formada por unas capas extras y es la responsable de la resistencia a enzimas, antibióticos.... En primer lugar tiene una capa llamada cortex o corteza formada por péptido glicano, a continuación otra capa llamada acutícula formada solo por proteínas, la cual se divide en 2 envolturas interna y externa, además de estos 2 hay otra mucho más gruesa que es el exosporio formado por lipoproteínas y ácido teitoico.

TEMA-5 OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

• TIPOS DE MICROORGANISMOS

SIMPLE(1 lente)

ÓPTICA cristal del ocular

COMPUESTO(2lentes)

Lentes del objetivo

Transmisión (100000 aumentos)

ELECTRÓNICO

Barrido (10000 aumentos)

La diferencia entre los aparatos está en el poder de resolución. El ojo humano distingue objetos inferiores al mm. Con el compuesto se puede llegar a 0,2 m con el electrónico 1nm, es decir tamaños moleculares.

MICROSCOPIA ÓPTICA COMPUESTA

Utiliza la luz blanca y está formado por: la base, juego de lentes de vidrio (condensador, que concentra la luz sobre la muestra. El condensador tiene un diafragma que nos permite regular la luz), platino (donde ponemos la muestra) lentes de objetivos (donde se forma la imagen) esta, se encuentra en una placa giratoria denominada revolver. Un microscopio compuesto posee 4 objetivos: 4-6x, 10x, 40x y 100x, en las que se utiliza aceite de inmersión. Arriba tenemos otra lente, que es el ocular que normalmente tiene un poder de 10x.

El número de aumentos total se halla multiplicando el número de aumentos del ocular por el número de aumentos que halla puesto en la lente del revólver.

Los aumentos superiores a 1000 no poseen gran nitidez por lo que no se utilizan.

Conceptos:

- Poder de resolución: Es la capacidad que tiene el microscopio de mostrar desiguales y separados 2

objetos que se encuentran muy próximos entre sí. Cuanto mayor sea el poder de resolución mayor nitidez y definición del microorganismo. Se expresa en m y matemáticamente se puede expresar como:

(luz blanca)

2 AN (apertura numérica)

- Apertura numérica : cada objetivo tiene su apertura numérica. Viene expresada $x = AN = n \cdot \sin \theta$, siendo n el índice de refracción que existe entre el objetivo y la muestra. Y θ es el semiángulo del cono de luz que penetra en el objetivo.
- Índice de refracción es la velocidad media que alcanza la luz cuando atraviesa un objeto. Cuanto mayor es la apertura numérica mayor es el poder de resolución del microscopio. Siempre que un rayo atraviesa 2 medios con distintos índices de refracción se desvía, por eso se pone el aceite, ya que este tiene el mismo índice de refracción que el vidrio 1,52, y así evita la pérdida de luz.
- Límite de resolución: Se define como el objeto más pequeño que podemos ver con el microscopio, y para calcularlo se utiliza la fórmula antes puesta.
- Profundidad de campo: es el espesor de la preparación enfocada al microscopio. Cuanto mayor sea el número de aumentos del objeto menor será la profundidad de campo.
- Área de campo de un microscopio: Es el diámetro de la preparación observada al microscopio. Se expresa en mm . Cuanto mayor es el número de aumentos del objetivo menor es el área de campo.

Dentro de la microscopia compuesta se pueden distinguir 4 tipos:

- Campo claro: Las bacterias se ven fuertemente iluminadas. Es la más frecuente. Un microorganismo se observa sobre fondo fuertemente iluminado.
- De contraste de fases: Tiene un condensador y un objetivo especiales porque tiene un diafragma anular impidiendo que la luz directa incida sobre la muestra, solo inciden los rayos laterales. Los rayos que no chocan contra la bacteria por el anillo de contraste, en cambio el que choca tarda más en llegar al objetivo. Cuando llegan al anillo de contraste se retrasan en su longitud de onda. Ese retraso de fases hace que se vea a la bacteria con diferentes contrastes y brillos. Esta microscopia fue descubierta por un físico llamado Friz Zernike, es importante porque se pueden observar el microorganismo vivo y se puede ver la estructura de la bacteria con detalle.
- De campo oscuro: No hace falta tñir, se diseñó para ver los microorganismos vivos y fue importante para ver la bacteria causante de la sífilis. En su condensador hay un diafragma anular de campo oscuro que solo deja pasar los rayos extremadamente laterales, con un ángulo tal que llegan a la muestra y salen desviados.
- De fluorescencia: Con luz ultravioleta. Tiene unos filtros de retención de ultravioleta que un microscopio normal no tiene.

La fluorescencia es la capacidad que tienen algunas sustancias de emitir una luz con una longitud de onda que cae dentro del espectro visible rojo o verde, cuando se hace incidir una luz de una longitud de onda menor como puede ser la ultravioleta.

Hay algunas bacterias que son fluorescentes de forma natural pero no todas lo son por lo que se hace una tñición con colorantes fluorescentes (fluorocromos), a la tñición se le denomina inmunofluorescencia. Esto se utiliza mucho en microbiología clínica. Se ponen los filtros de retención para que la luz ultravioleta no nos quememos los ojos, por eso en el fondo es oscuro.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se puede llegar a ver 1 nm, hay 2 tipos de transmisión y de barrido:

- **Transmisión:** Se consiguen hasta 100.000 aumentos. Las diferencias entre este y la microscopia óptica es que la luz se sustituye por electrones, las lentes del objetivo se sustituyen por una placa fotográfica o una pantalla fluorescente. Dentro del microscopio tiene que formarse el vacío. El poder de resolución es mucho mejor que es los ópticos, ya que la longitud de onda es 100.000 veces menor que la de la luz, es decir, es de $\lambda = 0,005\text{nm}$. Arriba del todo tenemos una corriente de electrones, estos atraviesan la lente del condensador, llegan a la muestra la atraviesan, llegan al objetivo y al final llegan a la placa fotográfica donde se puede ver la muestra. El problema es que los electrones tienen poco poder de penetración por lo que utilizando unos aparatos denominados micrótomos se hacen cortes muy finos de las bacterias y se ponen en una rejilla de cobre y además se tiñen de uranio, lentano, plomo, trulisteno o se espolvorean con carbono 14 (criofactura) que es como se hace un calco de la estructura de la bacteria. Esta microscopia se utiliza en el estudio detallado de las estructuras internas celulares.
- **Barrido:** Se consiguen entre 10.000 y 100.000 aumentos, se obtiene en una pantalla de televisión. La diferencia es que la muestra esta abajo del todo donde los electrones secundarios barren la superficie de la muestra y estos se recogen en la pantalla de televisor donde obtengo en la pantalla de TV una imagen tridimensional de la muestra.
- Los electrones secundarios son arrancados por los primarios cuando llegan a la muestra. Los primarios hacen el mismo recorrido que el microscopio de transmisión.
- A veces para asegurar que se arrancan los electrones secundarios se tiñe la muestra con oro o platino de ahí lo caro de este tipo de microscopia. La aplicación principal es la observación de las estructuras celulares externas.

TEMA 7 NUTRICIÓN

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES: C,O,N,H,P,S

La nutrición es el fenómeno fisiológico que aporta a la célula el material necesario para que la bacteria realice sus funciones vitales, ese material necesario son los nutrientes. Estos tienen que atravesar su pared celular mediante el transporte que puede ser activo o pasivo.

Los elementos que vemos en la bacteria son los que necesita. Del 80 al 90% de la célula es agua y el resto es su peso seco.

% de peso seco	Composición química
50	Carbono
20	Oxígeno
14	Nitrógeno
8	Hidrógeno
3	Fósforo
1	Azufre
10-3-10-4	Macronutrientes *
10-6	Micronutrientes *2

- *Macronutrientes: Son los iones que la célula necesita en concentraciones muy bajas (Na, Ca, Mg Si, Fe)
- *2 Micronutrientes: Co, Cu, ZN, Mn, Mo

FACTORES ORGÁNICOS DEL CRECIMIENTO

Son compuestos orgánicos que algunas bacterias necesitan para vivir en cantidades muy pequeñas, no lo

pueden sintetizar ej. PABA, ácido fólico, ácido nicotílico, ácido pantoténico, biotina, todas las vitaminas del complejo B6, la B, la D12, la K. Las bacterias que precisan de estos factores para crecer reciben el nombre de auxotrofos, y los que no lo necesitan reciben el nombre de prototofos.

FUENTES DE CARBONO

Fuente de C	Fuente de energía	Tipo de bacteria	Nombre	Ejemplos
CO ₂	Luz	Autótrofas fotosintéticas	fotolitotrofas	Bac. Fotosintéticas, algas y cianobacterias
CO ₂	Redox (inorgánicos)	Autótrofas quimiosintéticas	quimiolitotropas	Bacterias de H ₂ , nitrificantes y del S
CO	Luz	Heterótrofas fotosintéticas	fotorganotrofas	Bacterias rojas y verdes no del S
CO	Redox (orgánicos)	Heterótrofas quimiosintética	quimiorganotrofas	Bacterias restantes, protozoos, hongos y animales

El Oxígeno.

Las bacterias se pueden clasificar por la necesidad de Oxígeno de la siguiente manera:

- Aerobias estrictas: Necesitan el oxígeno atmosférico, si no pueden vivir.
- Microaerobios: Son las bacterias que necesitan oxígeno pero en una concentración menor que la del aire.
- Anaerobias: las hay de dos tipos
 - Facultativas son aerobios que necesitan oxígeno pero si no lo hay utilizan la fermentación.
 - Estrictos: en ausencia de oxígeno.

No todas las bacterias necesitan oxígeno, porque nosotros durante la respiración producimos O₂⁻, OH⁻, O₂⁻ (Ion peróxidos), son muy reactivos y se van robando uno a otro e⁻, formando una cadena y esto mata a las células. Nosotros tenemos enzimas como la catalasa y la dismutasa que catalizan esta reacción.

EL NITRÓGENO

Es importante para la síntesis de las proteínas, del ADN, el ARN...

FUENTES DE NITRÓGENO

N₂ NH₃ son los fijadores del nitrógeno una vez en el suelo.

NH₃ + H₂O NH₄ NO₂⁻ NO₃⁻ nitrificantes

NO₃⁻ N₂ bacterias desalinizadores.

EL HIDRÓGENO

Lo toman de la fermentación de los azúcares de los polisacáridos.

EL FÓSFORO

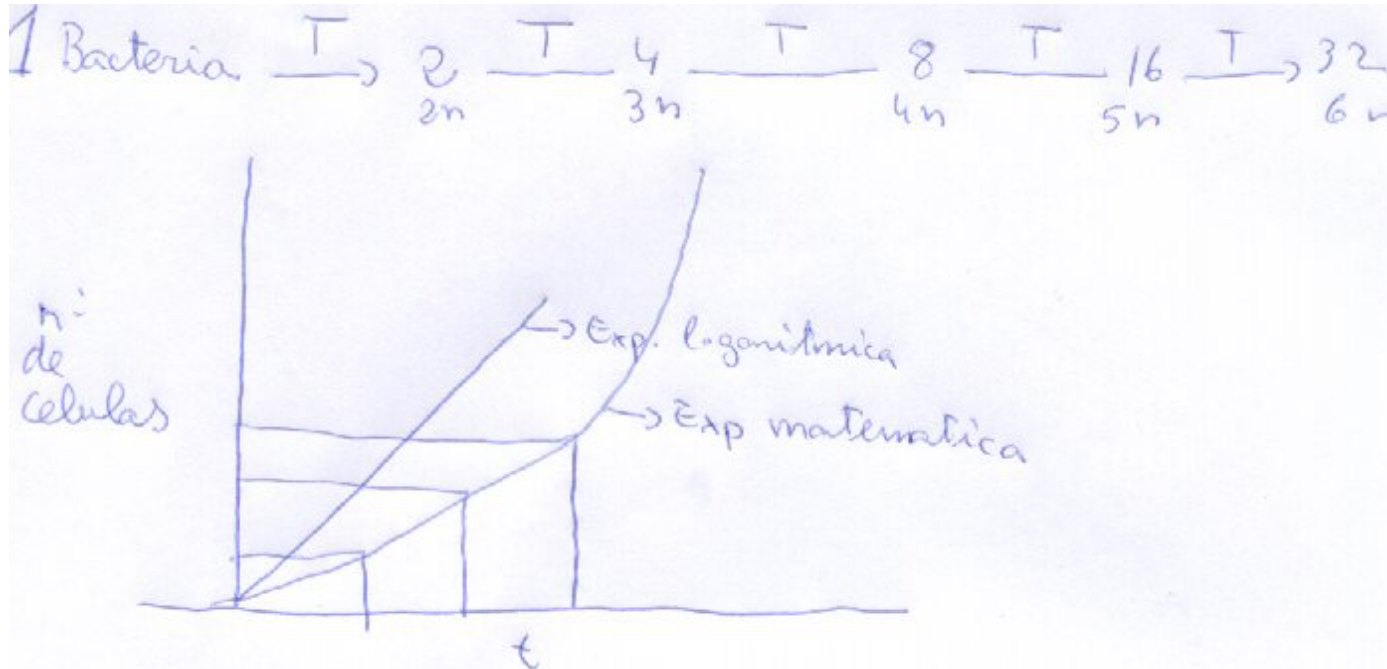
Es importante para construir ADN, ARN, Fosfolípidos, ATP y se toma en formas de PO_3^-

AZUFRE

Hay muchas proteínas azufradas. Lo obtienen del SO_4^- .

TEMA 8 CRECIMIENTO

El crecimiento es el aumento ordenado de los constituyentes y las estructuras de la bacteria, hace que se produzca un aumento del tamaño y el peso de las células, pero en las bacterias viene acompañado de la división celular por lo tanto es único porque implica un aumento del número de individuos. El crecimiento de la bacteria es exponencial. A el tiempo t se le llama tiempo de generación, n es el número de generaciones.



El nº total de bacterias que crecen se halla mediante la formula

$$N_t = N_0 \cdot 2^n$$

Aplicando logaritmos:

$$n = \frac{\log t - \log n_0}{\log 2}$$

$$\log 2$$

$$K = \frac{1}{T}$$

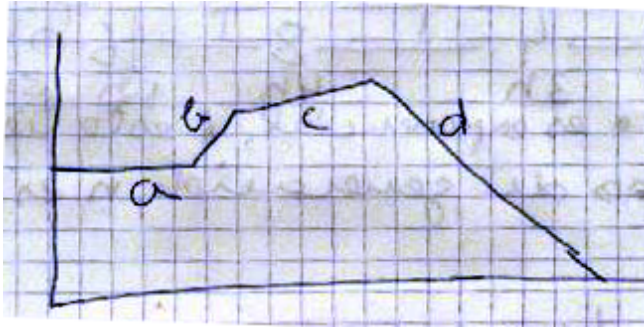
$$T$$

Donde k es la velocidad de crecimiento y t es el tiempo de generación.

$$K = \frac{1}{T}$$

$$T$$

CURVA DE CRECIMIENTO GENERAL



La fase a es la fase de latencia, las bacterias necesitan organizar sus enzimas, esta fase puede ser mas corta o mas larga dependiendo del grupo de bacterias. Cuanto mayor sea el tiempo de generación mayor es la fase de latencia, otro factor que influye es la edad, una célula joven tiene fases de latencia mas cortas que una vieja, a la célula joven le cuesta menos arrancar, otro factor seria la temperatura, ya que cuanto mas se aproxime a la temperatura optima mas pequeño será la fase de latencia.

La fase b se llama fase de crecimiento, empieza a dividirse las bacterias hasta que coincide con el n° máximo de células (dura entre 10 y 15 generaciones) esta fase depende de la T (tiempo de generación), a mayor T menor crecimiento, también depende de la temperatura, como en la fase a, cuanto mas se aproxime a la temperatura optima mayor crecimiento tendrá, y de los nutrientes en el medio, si los hay crecerá, del espacio y de la ausencia de metabolitos tóxicos.

La fase c recibe el nombre de fase estacionaria, en ella pasa el tiempo pero el numero de células permanece invariable, el numero de células vivas es igual al de muertas.

La fase d es la fase exponencial de muerte, en ella el numero de células muertas es superior al de las vivas.

Esta curva tiene una gran utilidad en la industria agroalimentaria:

P. ej. Las industrias de conservación de alimentos se interesan en la fase a, les interesa que no crezcan las bacterias, lo que hacen es el periodo de latencia para que no crezcan las bacterias, sometiendo a los alimentos a tratamientos térmicos o eliminando la humedad, porque las bacterias necesitan un 80–90% de agua..

A otras les interesa que la fase a sea lo mas corta posible, y que la fase B sea larguísima y nunca se llegue a la fase c, son los que necesitan la fermentación de bebidas alcohólicas, de vinagre, turrón, pan... Esto se consigue añadiendo nutrientes y eliminando metabolitos tóxicos, también se les da espacio suficiente. Esto se consigue mediante los quimiostatos, que son aparatos en los que se consigue un crecimiento en fase b continuo. También existe los turbidos, los cuales se diferencian en que tienen un ajuste automático, no manual.

TEMA 9 MÉTODOS DE MEDIDA DE CRECIMIENTO

Se pueden dividir en tradicionales y modernos:

- Tradicionales: que son mas efectivos pero mas lentos.
- Modernos: mas modernos pero menos efectivos.

TRADICIONALES:

DIRECTA:

- Microscópicos: Cuento de materias vivas y muertas.
- Contadores electrónicos celulares también cuenta tanto las vivas como las muertas.
- Culturales: que solo cuenta las vivas

Solo analizan una pequeña porción de muestra. Se expresan en Nt morf/ml. Si el liquido la muestra es liquida y por gramo si es sólida.

MICROSCÓPICOS:

- Cámara cuentaglóbulo: Es un porta con una gradilla en el centro. Se coge una cámara y se llena con un volumen de mi muestra y con un objetivo de 40 se estima el numero de microorganismos de un campo y por una formula matemática se calcula el ml. El volumen que yo pongo en la cuadrícula es $1/4000 \text{ mm}^3$ $N/\text{mm}^3 \times n \times D/F$. Las ventajas son la rapidez, la versatilidad y su buena aplicación en la medicina. Mientas que sus inconvenientes son la poca precisión, el recuento tanto de las células vivas como de las muertas y el recuento de falsos positivos.
- Método de Bread: Se coge una porta y se dibuja un cuadrado de 1 cm^2 y se le pone 0,01 ml de leche, se extiende sobre la superficie, se hace una tinción y con el objetivo se 100x cuento las bacterias. $Nr^2 = n \times 100 \text{ mm}^2$ $N = 100 \times 100 \times n / nr^2$ $r = \text{radio de campo del microscopio}$. $N = \text{incógnita}$ Factor del microscopio $100 \times 100 / nr^2$ -Ventajas son la rapidez, los recuentos altos y las muestras de suelo, agua, leche, zumos... Y los inconvenientes son la poca precisión y los recuentos de vivos y muertos.
- Sistema automatizado de recuentos de microorganismos: Es un aparato que tiene un orificio por donde entra la solución bacteriana y el orificio presenta una resistencia eléctrica y manda una señal al contador. Las ventajas son la rapidez, los recuentos altos y su precisión, y sus desventajas son los recuentos falsos positivos y que no distingue entre vivos y muertos.

MÉTODOS CULTURALES:

Son métodos que emplean medios de cultivo. Hay tres métodos:

- Recuento en placa: contamos materias vivas en un medio de cultivo sólido.
- El numero mas probable: materias vivas en medio de cultivo liquido.
- Método de la membrana filtrante.

RECUESTO EN PLACA: Parte de una premisa que dice que una bacteria viva en un medio de cultivo sólido forma una colonia.

Normalmente las muestras hay que diluir la muestra original en diluciones sucesivas, hasta dar con una que de en un medio de cultivo colonias contables. $Nt \text{ Mo/ml} = n \times D-1$.

Recuento en placa es similar al método mas tradicional para el recuento total de microorganismos. Se tiene que hacer con un medio de cultivo que tenga nutrientes básicos, azucars, proteínas, nutrientes necesarios para que la bacteria pueda crecer agar nutritivo o placa count. La temperatura optima para patógenos es igual a 37°C y para las no patógenas es 30° . Para el recuento en placa se cultivaran a 30° ya que a esta temperatura crecen todos. Si queremos hacer el recuento total de hongos y levaduras el medio de cultivo que se utiliza es de sabouraud con antibióticos como el cloranfenicol y la temperatura optima es la de 28° .

Las ventajas son el recuento de microorganismos vivos y la gran especificidad en cambio las desventajas son la lentitud y la excesiva manipulación.

NUMERO MAS PROBABLE: Es un método probabilistico inventado por McCrady y demostró que el resultado tiene una fiabilidad de un 95%. Las diluciones se llevan a medios de cultivo líquidos. Aquellos tubos turbios quiere decir que han crecido bacterias. Hay tablas de 2,3,5 diluciones y de 2,3,5 muestras.

La colimetria es la aplicación del NMP para el análisis de agua para encontrar bacterias coliformes.

Las ventajas de este método son el recuento de microorganismos vivos, especificidad, mas rápido que el recuento en placa y la utilización de menos material. Las desventajas es la menor precisión en comparación con el recuento en placa.

MÉTODO DE LA MEMBRANA FILTRANTE: Sirve para determinar el numero de microorganismos en nuestros líquidos, normalmente en agua, hace falta un aparato de filtración.

La membrana es de celulosa o nylon y tiene un poro de 0,45 m, mas pequeño que la bacteria. Se lleva la membrana a la superficie de una placa petri y por capilaridad los nutrientes serán absorbidos por las bacterias y estas formaran colonias en la membrana.

Para saber el numero total de microorganismos se cuenta el numero de colonias y dependerá de los ml filtrados.

Hay que filtrar 100 ml para hacer un análisis de agua oficial.

Las ventajas son la rapidez y el requerimiento de poco material, en cambio el único inconveniente es el recuento de muestras poco contaminadas.

INDIRECTOS:

No se cuentan los microorganismos directamente, se miden las características intrínsecas de ellos. Son mas lentos porque hay que relacionarlo con un método directo. Los mas utilizados son:

- **Turbidimetria:** Se mide la turbidez de las muestras liquidas y se lleva a cabo en los espectrofotómetros y constan de tres partes: una lampara, un tubo central y un detector de luz. Si el tubo esta muy contaminado la cantidad de luz transmitida es menor.
- **Método del azul de metileno:** En su forma oxidada es azul y en su forma reducida es incolora. Se cogen 10ml de leche y se le añade 1 ml de azul de metileno y la leche se vuelve azul. Se lleva a incubar a 37°C y las bacterias reducen el azul de metileno y la leche saldrá blanca. Cuanto mayor es el numero de bacterias menor es el tiempo en desaparecer el color azul. Si pasan 8 horas y la leche es azul la calidad es excelente, alrededor de 20000 mo/ml. De 6 a 8 horas y el color desaparece la calidad es buena, alrededor de 100000 mo/ml, en menos de 2 horas calidad mala unos 10 millones de bacterias/ml y si es en pocos minutos calidad pésima 100 millones de bacterias. Hay otra manera de medir la turbidez, mediante la escala de Mc Forland, que es a mano. Son 6 tubos : 0'5, 1,2,3,4,5, 150·106 b/ml, 600·106, 900·106, 1200·106, 1500·106 respectivamente. En los tubos hay soluciones de SO₄Ba.
- **MÉTODOS MODERNOS:** impendancia, recuento en aire y superficie, epifluorencia, moleculares.

TEMA 10 AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

Un medio de cultivo es una preparación artificial liquida, sólida o semisólida, compuesta por nutrientes y utilizada para hacer crecer microorganismos. Son medios que intentan recrear artificialmente el medio real que necesitan las bacterias para crecer.

Para casi todas las bacterias existen medios de cultivo excepto para dos microorganismos *Freponella pallidum* y *Microbacteriun leprae*, que no se pueden cultivar en un laboratorio.

CLASIFICACIÓN:

- Basada en la composición química:

- Sintéticas o químicamente definidos: aquel en el que sabemos todos los componentes químicos.
- Complejo: No sabemos exactamente su composición química Ej. Sangre, tejidos animales, extractos etc.
- Dependiendo del porcentaje de agar:
 - ◆ líquidos: aquellos que no llevan agar, es decir, proteínas, azúcares, lípidos caldo.
 - ◆ Semisólidos: es un caldo con un 0,5% con una textura parecida a la de la gelatina.
 - ◆ sólido: 1,5% de agar.
 - ◆ Que morfológicamente aíslan los medios de cultivo:
 - ◇ Medios de cultivo común: general, permite el crecimiento de la mayoría de los microorganismos en una muestra glucosa, azúcares y proteínas agar nutritivo.
 - ◇ Medios de cultivo enriquecidos: Es un medio de cultivo común al que se le añade una sustancia que me permita aislar un número de microorganismos presentes en la muestra.
 - ◇ Medios de cultivo selectivo: Son los más importantes, permiten el crecimiento restringido de un grupo de microorganismos.
 - ◇ Medios de cultivo diferencial: Lleva una sustancia (sangre, suero, tejidos animales) permite la diferenciación de dos tipos de bacterias.
 - Medios de cultivo indicador: Lleva un indicador de pH por ejemplo se pone en un tubo lactosa rojo fenol y la E.coli fermenta lactosa y forma ácidos. El rojo de fenol a pH neutro es rojo pero en medio ácido es amarillo.

COMPONENTES PRINCIPALES DE MEDIOS DE CULTIVO:

- El agua destilada: No tiene que contener ni Ca^{2+} , ni Mg^{2+} .
- Peptonas: proteínas hidrolizadas, cadenas pequeñas de aminoácidos que las bacterias pueden digerir, son fuente de N para las bacterias.
- Extracto de la carne y de las levaduras: Son ricos en vitamina B y factores orgánicos del crecimiento.
- Agar: Sustancia mucilaginosa que se añade a los medios de cultivo para hacerlos sólidos. Se extrae de unas algas de sitios exóticos llamadas *Gelidium corneum*. Ha sustituido a la gelatina en los medios de cultivo. El agar no es degradado por ninguna bacteria, ni aporta nutrientes al medio de cultivo. Se utiliza porque tiene una temperatura de fusión cercana a la de ebullición del agua. Pasa de sólido a líquido a los 80°C y a los 45° se hace sólido.
- NaCl: Para evitar la autólisis de las bacterias, es decir, para aumentar la presión osmótica de las bacterias.
- Azúcares: Principalmente glucosa, también se utilizan otros, como la sacarosa, fructosa..., Son fuentes de energía y de C. También se añaden por razones taxonómicas o de clasificación. Se utilizan varios azúcares, y se observa cual de todos es el que necesita el microorganismo.
- Sustancias tampón: Para neutralizar el pH ácido de los medios de cultivo. Ej. $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K} + \text{ClH} \rightleftharpoons \text{PO}_4\text{H}_2\text{K} + \text{KCl}$ El ácido es convertido a una sal y la bacteria puede continuar creciendo.

PREPARACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO:

Normalmente se realiza en matraces de vidrio para elegir el recipiente adecuado se coge un matraz que tenga doble capacidad respecto al volumen que queremos

preparar.

Se pesa por separado los ingredientes y los añades al matraz, se añade agua, se mezcla bien y se agita manualmente, también hay que calentar para la buena disolución fundamentalmente si lleva agar. Se deja enfriar y se mide el pH porque hay que ajustar el pH del medio al de los microorganismos. 7 crecimiento de bacterias, 5 mohos, 6 levaduras.

Una vez medido se pasa del matraz a tubo si es necesario y luego esterilizar el medio de cultivo que se consigue gracias al autoclave alcanzando los 121° durante 20 minutos. Pasado este tiempo se deja enfriar y si queremos preparar placas vertemos el medio y dejamos que se enfríe.

Ahora los microorganismos vienen en polvos lo único que se hace es añadir agua y esterilizar.

2. MÉTODOS DE CULTIVO:

Tienen como objetivo el aislamiento de un microorganismo para obtener cultivos puros de microorganismos.

Un cultivo puro es una población bacteriana formada por células clónicas y que procede de la misma célula antecesora común. Si esta en un medio de cultivo sólido se le llama colonia.

Hay varios métodos:

1. Para aerobios

- Triple estría: Se aplica para el cultivo de bacterias aerobias. Se trata de dibujar 3 estrías sobre un medio de cultivo sólido.
- Micromanipulación: Es un método más sofisticado se realiza mediante el micromanipulador, el cual hace el aislamiento de la bacteria. Es un microscopio que tiene incorporado una microjeringa con una microaguja. Se pone una suspensión bacteriana al microscopio y superpuesto se ve la punta de la aguja, la cual se dirige hasta la bacteria que se quiere aislar, se coge y posteriormente se deposita sobre la placa. También se utiliza para el cultivo de bacterias aerobias.

2. Para anaerobios:

- Jarras de anaerobios, las cuales tienen un aspecto de cubo de basura. Es un cubo que tiene una tapa. También las hay con 2 válvulas.
- Mediante una vela: Se enciende y se tapa con una tapa tradicional.
- El método más caro es utilizando una cámara de anaerobios mediante unas bombas de vacío.
- Otra forma para el medio líquido es mediante la adición de vaselina. Antes de ponerle el tampón se le pone un dedo de vaselina.

CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS:

Hay varios métodos los mas utilizados a corto plazo podrían ser la refrigeración.

La refrigeración entre 4–6° puede conservar la materia entre 3–4 meses, a los 3 meses hay que resembrar.

Para largos periodos existen varios métodos, como por ejemplo la liofilización y la congelación profunda:

- La liofilización se guarda la bacteria en una ampolla en forma de polvos. Se coge un tubo y se congela, se deseca mediante la aplicación de un vacío, con lo que se produce la sublimación, se coge un soplete y se cierran las ampollas. Esta ampolla puede conservarse durante años. Para reutilizarla se rasga con una cuchilla en la parte superior y se hidrata el polvo mediante agua.
- La congelación profunda consiste en congelar el cultivo a –80°, es rápida y pueden durar las bacterias entre 1 y 2 años. Se utilizan criotubos (tubos de plásticos con un líquido en el cual hay bolitas sumergidas, las cuales en el exterior son lisas y en el interior irregulares, que es donde se quedan las bacterias). Una vez dentro se le quita el caldo y se congela a –80°. Para reutilizarla se utilizan unas pinzas estériles y se llevan a una placa petri incubándolas.

COLECCIONES DE MICROORGANISMOS:

Son entidades que se dedican a aislar en ampollas las bacterias. Las mas importantes son:

- ATCC American Type Culture Collection, su base esta en Washington.
- NCTC National Collection of Type Cultures que esta en Londres.
- CECT Colección española de cultivos tipo. Burjassot.

TEMA 11 AGENTES FÍSICOS SOBRE MICROORGANISMOS:

Bactericida quiere decir que mata y bacteriostático que detiene su crecimiento pero no los mata.

La esterilización es el proceso de destrucción de toda forma de vida microbiana no hay grados o las mata o no.

La desinfección no es una destrucción total.

RADIACIONES:

Dependiendo del tipo de su longitud de onda, su intensidad y su duración afectará de una forma o de otra.

Hay 2 tipos de ondas las ionizantes y las no ionizantes; Las no ionizantes tienen una longitud de onda mayor de 1 nm y las ionizantes van de 1 a $1 \cdot 10^{-12}$ nm, son ondas que ionizan moléculas o compuestos como p. Ej el agua, son radiaciones toxicas son los x, gama, y rayos cósmicos.

Las no ionizantes, son ondas de radio de 107 las microondas 105–107 no tienen un efecto directo sobre las bacterias pero si lo es indirecto, ya que producen La luz UV lesiona el ADN porque forma un dimero se timina, haciendo que se unan dos timinas. Esta mata cuando su longitud de onda esta entre 10 y 380 nm. La luz UV lesiona el ADN porque forma un dimero se timina, haciendo que se unan dos timinas. luz UV lesiona el ADN porque forma un dimero se timina, haciendo que se unan dos timinas. Produciendo que al replicarse las bacterias se produzca la inhibición de la replicación de su ADN, apareciendo una bacteria mutante.

La aplicación de la luz UV es en las lámparas de mercurio o germicida de luz UV, que emiten luz a 260nm, para esterilizar del aire de hospitales, cafeterías, guarderías. La luz UV es bactericida.

Respecto a los ionizantes: Los rayos X se utilizan para la esterilización de todo tipo de material biosanitario, incluso en USA existen alimentos conservados por rayos X, los rayos gamma son mas difíciles de manipular y sus aplicaciones son limitadas, se utilizan para esterilizar material de plastico y grandes volúmenes de líquido. Los cósmicos no se aplican.

PRESIONES:

- La presión mecánica: Las bacterias en general aguantan todas las presiones mecánicas desde la del océano hasta cualquier otra. Ellas resisten hasta 500 atmósferas. Hay unas bacterias que se han descubierto en pozos petrolíferos que aguantan 6000 atmósferas y se llaman leofilas. No se puede hacer nada con las presiones mecánicas.
- La presión osmótica: En un medio isotónico s produce una salida y una entrada de nutrientes y liquido normal. En el hipotónico se produce la plasmotisis, entrada de agua se hincha y estalla, y en el medio hipertónico sale el agua masivamente y se separa de la pared celular y la bacteria muere (plasmolisis). Este hecho es aplicado en la conservación de microorganismos para frutas mediante azúcares, también con la sal para el jamón, a pesar de que existen algunas bacterias azucaradas que son sacarófilas y las de la sal que son halofilas.

ONDAS SONORAS

Hay de 2 tipos las sonicas que son aquellas con un a frecuencia de 9000 ciclos/s que son audibles, no son nocivas para las bacterias, y las ultrasónicas que no son audibles y alcanzan una frecuencia de 200000 ciclos/s.

Las ultimas son emitidas por ultrasonidos y si que destruyen a las bacterias, porque matan por cavitación. Los ultrasonidos hacen que se formen burbujas de aire en el interior de la bacteria y estallen cortando las estructuras celulares.

PH

Todas las bacterias tienen un rango de pH optimo que es en el que crecen favorablemente.

TEMA 12 MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO Y HÚMEDO.

El calor es el método mas frecuente, mas eficaz, mas económico y mas fácil de controlar. Hay 2 tipos de calor, el seco y el húmedo.

EL CALOR SECO

El seco mata a las bacterias por oxidación y se han desarrollado métodos que aplican el calor seco como:

El flameado que consiste en calentar el asa de siembra al rojo vivo, es 100% eficaz.

Otro método es la incineración que consiste en quemar directamente a llama, se utiliza para quemar bolsas pañuelos de papel, restos de animales muertos, ropas...

Otro son los esterilizadores de aire caliente, el cual produce la esterilización de todo lo que se pone en el interior, se utilizan para material de vidrio, a una temperatura de 180°, durante 2 horas para destruir toda forma de vida microbiana.

EL CALOR HÚMEDO

Son métodos mas rápidos, porque el agua ayuda a que se rompan los puentes de hidrógeno que unen las proteínas. Hay varios:

- Ebullición: Que consiste en hervir 100° una solución de bacterias durante 10 minutos, se destruyen la mayoría de células vegetativas, hongos, virus pero no sus esporas. Por lo tanto no siempre es muy eficaz. P.ej. resiste el virus de la hepatitis, el cual resiste 30 minutos a 100° algunas esporas resisten hasta 20 horas. Este método es aplicado en platos, vasos, porcelanas...
- Tindalización: Descubierta por Tyndall, consiste en calentar la muestra a 70–80° durante 30 minutos y 3 días consecutivos. El primer día se matan las bacterias, pero persisten las esporas, las cuales se convierten en bacterias el día siguiente y son destruidas, pero por seguridad se espera otro día mas y se vuelve a hervir. Este método se utiliza para las sustancias que sean destruidas por el calor a temperaturas elevadas como las vacunas, las toxinas, los antibióticos, ingredientes de medios de cultivo, glicerina, urea...
- Vapor a presión: Es el más utilizado y el de mayor aplicación. Se consigue en el interior de los auto-claves, que son aparatos de esterilización, los cuales pueden utilizar un rango rápido de tiempos y temperatura, el tratamiento estándar es de 121° durante 20 minutos. Es un recinto cerrado, en el cual se coloca lo que se va a esterilizar, se cierra la puerta, se le añade agua, el vapor desplaza el aire frío y cuando por la llave de fuga sale vapor de agua hay que cerrarla. Cuando la presión aumenta y llega a 1 atmósfera el autoclave esta a 131° y se deja durante 20 minutos, también existen otras relaciones de tiempo-temperatura, p.ej. 115° a 30' ó 135° a 10'. Se utiliza para medios de cultivo, ropa de uniforme, material de vidrio, todo material que resista el calor y la humedad. Lo que esteriliza no es la P si no la T.
- Pasteurización: Para la leche y los derivados lácteos, cervezas o vinos. La tradicional consistía en calentar a 62,8° durante 30' la leche porque esta transmitía el bacilo de la tuberculosis, en 1930–35 hubo una epidemia de fiebre Q que lo transmite el *Coxsackie burnetii* era una enfermedad infecciosa e tipo respiratorio que causaba neumonía. Esta bacteria era resistente a 62,8° y se subió la temperatura a 72° y recibió el nombre de pasteurización de alta temperatura, durante 15 segundos. Esta temperatura destruye las células

vegetativas, pero no las esporas, y esta es la razón de porque la leche, la cerveza o el vino se conservan una vez abiertos en la nevera.

· Uperización: Aplicado a la industria láctica y a los zumos, se utiliza para esterilizar la leche y sus derivados. (UHT, ultra high temperature) consiste en la esterilización de la leche a 150° durante menos de 1 segundo, las ventajas es que una vez abierto no hace falta conservarlo en la nevera.

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN:

Consiste en el paso de un líquido a gas a través de una membrana porosa por donde van a quedar retenidos los microorganismos. El filtro de Chamberland–Pasteur era de porcelana y fueron los primeros en utilizarse, estos fueron sustituidos por los de vidrio poroso, posteriormente por los de membrana de papel o plástico. Eran papeles muy finos con muchos poros de diámetro muy pequeño 0,2 m–0,45 m la primera para los virus y la segunda para las bacterias, se utilizan para filtrar líquidos. En los últimos años han aparecido para filtrar el aire aparatos que tienen filtros HEPA hechos de fibra de vidrio, tamaño de por de 0,3 m High efficiency particulate air filter, están en quirófanos y salas de quemado.

TEMA-13 CONTROL QUÍMICO DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

DESINFECCIÓN

Es el proceso de destrucción de células vegetativas, bacterias patógenas pero no necesariamente endosporas ni virus. Un desinfectante es un compuesto químico que se aplica sobre una superficie o un material, si se aplica sobre la piel recibe el nombre de antiséptico. Para ser eficaz debe de cumplir los siguientes requisitos:

- ◊ Muy eficaz a bajas concentraciones.
- ◊ Amplio rango de actividad antimicrobiana a concentraciones bajas.
- ◊ Tiene que ser estable, su acción no debe de limitarse solo al momento de uso, sino que sea duradero.
- ◊ Tóxico para los microorganismos a temperatura ambiente.
- ◊ No tiene que ser tóxico ni para el hombre ni para los animales.
- ◊ Capacidad penetrante
- ◊ Capacidad detergente.

MECANISMO DE ACCIÓN

- ◊ Destruyendo la pared celular p. Ej. Fenol y NaClO
- ◊ Rompiendo la membrana citoplasmática p. Ej. Fenol, alcoholes o detergentes.
- ◊ ADN como los hipocloritos, el I, el óxido de etileno, los metales pesados.
- ◊ Ribosomas como el óxido de etileno y el glutaraldehído.
- ◊ Citoplasma sales de mercurio, fenol a altas concentraciones y el glutaraldehído.

EL FENOL: Es un desinfectante histórico, fue el primero que utilizó Lister, hoy en día no se utiliza porque es tóxico, corrosivo y huele mal, su mecanismo de acción a concentraciones muy bajas la pared celular, a medias concentraciones la membrana citoplasmática y en elevadas concentraciones afecta al citoplasma, destruyendo las proteínas bacterianas. Para que tenga efecto se necesita 1% de concentración. Se utiliza a concentraciones muy bajas, menores del 1% en pastillas como el hibitane.

Han surgido los derivados fenolicos que son compuestos modificados para disminuir los efectos adversos y tienen una gran actividad microbiana como los cresoles que se utilizan como desinfectantes ambientales, otro derivado el fenil fenol y tiene una gran actividad antimicrobiana, y se utiliza como antifungico. Otro derivado es el hexacloro se utiliza como ingrediente de jabones, productos de higiene femenina, colutorios... debido a su gran actividad contra estafilococos y estreptococos que causan infecciones en la piel.

HALÓGENOS: Son desinfectantes antimicrobianos muy eficaces, utilizados hace mucho tiempo. Pueden actuar solos o combinados, y los mas importantes son: Yodo, cloro y fluor.

- El mecanismo de acción del yodo es la inhibición de las proteínas bacterianas, se usa para las heridas. Sólo se usa en forma de tinturas de yodo, que son unas disoluciones que manchaban mucho (soluciones hidroalcoholes de yodo) el problema era que manchaban e irritaban mucho la piel. Ahora se utilizan yodo mas detergente que recibe el nombre de iodoformo, el detergente libera poco a poco el yodo y tiene un efecto duradero p.ej. el Betadine.
- El cloro se aplica principalmente en la desinfección de aguas. Su acción se debe a la formación de ácido hipocloroso, cuando el cloro se pone en contacto con el agua. Se puede utilizar combinado con detergentes formando las cloraminas $Cl_2 + NH_3$ que se utilizan para desinfectar aguas municipales. Otros compuestos son los hipocloritos de calcio que es un blanqueador casero y el de sodio comúnmente lejía.
- El fluor es un desinfectante que se añade a dentríficos, colutorios o pastas de dientes. Se utiliza en los países nórdicos para desinfectar el agua, pero es muy caro.

ALCOHOLES: Son muy buenos agentes antimicrobianos, destruyen células vegetativas, esporas e incluso algunos virus.

Su mecanismo de acción es desnaturalizar a las proteínas y destruir a la membrana citoplasmática. Ej. Etanol y el isopropanol.

EL etanol se utiliza al 70% para que se desnaturalicen las proteínas se necesita agua. Nos es un buen antiséptico porque el alcohol coagula proteínas de nuestras células y por debajo de estas crecen bacterias. En la practica se utiliza para desinfectar material quirúrgico en los hospitales.

El isopropanol se utiliza mas porque es mas barato y menos volátil que el etanol.

METALES PESADOS: Tienen acción oligodinámica, pequeñas cantidades matan grande cantidades de bacterias. Se combinan con los grupos sulfihidrilos de las baterías, produciendo la desnaturalización de las proteínas.

- Plata: Para prevenir la oftalmia neonatorum, es una infección acular del bebe por consecuencia del paso por el conducto vaginal en el parto si la madre tiene gonorrea.
- Mercurio: Es un desinfectante muy antiguo, el cloruro de mercurio ha sido utilizado mucho tiempo contra las bacterias. Hoy en día no se utiliza porque es tóxico, irrita la piel como antiséptico. Hoy en día es

sustituido por los compuestos orgánicos del mercurio, como los mercuriocromos y los mercuriolatos, un ej. Es la mercurmina el problema de esta es que al lavar la piel desaparece el efecto.

- Cobre: En forma de sulfato tenemos el CuSO_4 , se utiliza en la vida para prevenir el crecimiento de hongos, es un ingrediente del caldo badoles. También como ingrediente en pinturas, para evitar el enmohecimiento de las paredes, tiene acción antifúngica y también es alguicida.
- Hay otros metales como el zinc que son utilizados en colutorios bucales o en las pinturas.

TEMA 14 CONTROL QUÍMICO II.

DETERGENTES ANIÓNICOS Y CATIONICOS.

Hay de 2 tipos aniónicos y cationicos. Los aniónicos deben su acción a la parte cargada negativamente, el anion y el cationico a la inversa.

Los aniónicos como p. Ej. Los jabones (*Lauril sulfato sódico*) Su mecanismo es la eliminación mecánica de los microorganismos durante el lavado.

Los cationicos son mas efectivos y son derivados del NH_4 . hay muchos, principalmente hay 2 el cloruro de cetipiredonio y el cloruro de benzolconio. Forman parte de colutorios bucales y son compuestos incoloros e inodoros.

ÁCIDOS ORGÁNICOS.

Tienen actividad antifúngica, inhiben el crecimiento de hongos. No por ser ácidos.

Se utilizan como conservantes en la alimentación como el ácido sórbico o el sorbato sódico en el queso.

Lo mismo ocurre con el benzoico o su sal el benzoato de potasio para el agua y las bebidas refrescantes.

Otros ejemplos son los parabenes que se utilizan en cosméticos líquidos y champúes.

Otro ejemplo es el propionato cálcico que tiene activada antifúngica y se añade al pan.

AGENTES ESTERILIZANTES GASEOSOS.

El que mas se utiliza es el óxido de etileno. Son gases CH_2CH_2 epóxido, son esterilizantes y destruyen cualquier forma de vida microbiana. Se utilizan en cámaras herméticas para esterilizar ropas, camas, colchones, materiales plásticos, válvulas del corazón. Entre 4 y 18 hora. Es el método mas efectivo pero no se utiliza domésticamente, ya que estos gases son cancerígenos. Su mecanismo de acción es la desnaturalización de las proteínas bacterianas. S un gas que no se usa de forma pura, se combina con el CO_2 y el nitrógeno.

ALDEHÍDOS.

Uno es el formaldehído y el otro el glutaraldehído.

El primero es un gas que se utiliza en spray para desinfectar ambientes. El problema es su mal olor. En forma líquida y a un 37% es el fenol. Se utiliza para embalsamar cadáveres, muestras biológicas, inactiva bacterias y virus.

El segundo se utiliza de forma líquida, es líquido para desinfectar las mascarillas de oxígeno, esporicida, es el único líquido esterilizante. Inactiva proteínas bacterianas.

AGENTES OXIDANTES.

Matan a las bacterias por oxidación.

Uno de ellos es el ozono, el cual es reactivo y tóxico, es el responsable del olor a fresco después de una tormenta. Se utiliza para el agua en Europa, pero es más caro y tiene un efecto poco residual.

Otros son los peróxidos como el agua oxigenada, o el peróxido de zinc, o el de benzoilo. Su acción es antiséptica, se utilizan para herida, pero su acción es limitada, porque nuestras células tienen catalasa y la descomponen en agua + oxígeno.

También se utiliza en la industria alimentaria, en el envasado antiséptico porque el agua oxigenada, no sobre la piel, sino en materiales es esporicida y viricida, se utiliza antes de ensamblar los cartones de leche, se sumerge en una solución de agua oxigenada caliente.

2

27

2

27