

Apuntes de Microbiología

Tema 1: Introducción histórica a la microbiología

Definición: Estudio de los organismos que no pueden verse a simple vista (menores de 1mm)

Los microorganismos son de tamaño muy variable:

Escherichia coli: 1x3 micras

Epulopiscium: 80x600 micras

Thiomargarita: 100x750 micras

Nanochlorum 1x2 micras

Su estudio está determinado por la metodología, como es el empleo del microscopio, etc. La microbiología estudia los virus, los procariotas, los protozoos, hongos y algas; y el objetivo principal de la microbiología es el estudio de la naturaleza de los procesos vitales como la fisiología, la estructura y función, genética y taxonomía. Algunas aplicaciones de la microbiología pueden ser en el campo de la alimentación, la biotecnología, medioambiente, la agricultura y la medicina.

Los microorganismos han causado daños al ser humano durante toda la historia de la humanidad. Por ejemplo en el siglo XIV, 25 millones de personas murieron por la peste, y en la actualidad misma, se siguen buscando curas contra el sida o la malaria.

Fases en la historia de la microbiología:

1) Periodo especulativo:

Desde la antigüedad hasta la creación de los primeros microscopios

Se intuye que hay actividades microbianas. Las enfermedades infecciosas se creía que estaban relacionadas con los “miasmas”: Lucrecio, un médico romano, los llamó “semillas de enfermedad”, mientras que Frascatoro (1478) dijo que había criaturas vivas e invisibles que nos transmitían las enfermedades.

2) Primeros microscopios:

Van Leeuwenhoek inventó el microscopio y dibujó algunas bacterias que veía. Cuando se empiezan a ver los microorganismos se empezó a plantear si existía la generación espontánea, porque no se sabía de dónde venían.

También se empezó a plantear si los microorganismos son la causa de todas las enfermedades. A partir de estas cuestiones surgió la microbiología como ciencia. Redi (1625-1697), en el siglo XVII hizo experimentos para descartar la posibilidad de la generación espontánea. Needham (1713-1781) a su vez, comprobó el crecimiento de microorganismos hirviendo caldo de carne de cordero y aislándolo en un matraz, pero no había esterilizado previamente el matraz.

Spallanzani (1729-1799) hizo otro caldo y lo cerró herméticamente en un recipiente esterilizado. En este caso no se desarrollaron microorganismos. Fue una de las primeras demostraciones exitosas en contra de la generación espontánea.

Finalmente, Pasteur (1822-1895) modificó un matraz poniéndole un “cuello de cisne” y hirvió un caldo de cultivo. A pesar de que el recipiente estaba abierto al medio exterior, el caldo no se contaminó. Si el medio no contaminado se acercaba al “cuello de cisne”, este entraba con los microorganismos que ahí se habían quedado atrapados y se contaminaba.

Tyndall y Cohn (1820-1893) descubrieron las bacterias termoresistentes (las esporas) y demuestran que el polvo transporta y contiene bacterias (1877).

3) Cultivo de microorganismos:

Koch desarrolló los cultivos puros o axénicos (de un solo microorganismo) y comprobó que cuando se multiplica en medio sólido, forma una colonia. Petri desarrolla las “placas de petri” para aislar los cultivos puros.

Los postulados de Koch:

- El agente patógeno debe estar presente en los individuos enfermos
- El mismo debe poder aislarse del individuo en un cultivo puro o axénico
- El microorganismo crecido en cultivo puro puede inocularse en individuos sanos, enfermándolos.

Los postulados resaltaron la importancia de los cultivos axénicos en los laboratorios, que permitieron avances técnicos en la tinción de microorganismos.

4) multitud de enfoques en el estudio microbiano:

Wingoradsky contribuyó a la microbiología del suelo, descubriendo bacterias que oxidan los metales para obtener energía, bacterias que transforman dióxido de carbono en materia orgánica, etc.

Beijerinck aísla una bacteria fijadora de nitrógeno y también aísla unas bacterias sulfato reductoras.

La Estructura Celular:

Las células están rodeadas de la membrana plasmática que aísla la célula del exterior. Algunas tienen una pared celular como las células vegetales y algunos microorganismos. Dentro de la célula hay siempre ribosomas y macromoléculas. Hay dos tipos de células: las procariotas, que no tienen un núcleo definido, y las eucariotas, que sí lo tienen. Las bacterias y las arqueas son ambas procariotas. Las algas, los hongos, protozoos, plantas superiores y animales, en cambio, son eucariotas.

El reino monera, al igual que el protista, se compone de procariotas. El reino Fungi, Animalia y Plantae tienen tanto células eucarióticas como algunos protistas.

Para dividir los microorganismos en familias, nos fijamos en el ARN ribosómico, que tiene más regiones con la misma secuencia de unos microorganismos a otros, pero otras regiones que son muy variables y específicas. Entonces se comparan los ARNs encontrando relaciones filogenéticas y evolutivas entre los microorganismos.

Podemos diferenciar tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya (Bacteria, arquea y eucariota). Las bacterias y las arqueas son células procariotas.

Evolutivamente los tres dominios provienen de uno común, y se fueron escindiendo primero las bacterias, luego las arqueas y por último las eucariotas.

Las arqueas se diferencian de los otros dos porque en su membrana plasmática se dan enlaces éster, mientras que en bacterias y eucariotas se dan enlaces éster.

Bacterias: Se pueden encontrar en cualquier parte. Hay una gran variedad de bacterias.

Arqueas: Hay tres grandes grupos: Termófilos, halófilos (afines a la sal) y Metanógenos (producen gas). Las arqueas termófilas y halófilas son más extremas que las bacterias que también son halófilas y/o termófilas.

Eucariotas: Hay también tres grandes grupos: hongos, algas y protozoos. Las algas tienen clorofila, los hongos son filamentosos o unicelulares (que son los que se estudian como microorganismos) y no tienen clorofila.

Los protozoos son móviles e incoloros, ingieren otros organismos o partículas orgánicas (heterótrofos), no tienen pared celular y son de vida libre, aunque algunos patógenos necesitan un huésped.

Tema 2: Microscopia y tinciones

Un microscopio consta de tres factores importantes, el aumento, el contraste y la resolución.

- **El aumento**

El aumento es producido por los objetivos, que son lentes convexas (forma de huso), que desvían los rayos de luz por refracción. Con menor distancia focal, mayor aumento.

- **El contraste**

El contraste es una diferencia en la intensidad de la luz, lo que nos permite apreciar que una zona de la imagen es diferente de otra zona próxima o del fondo del campo. Para aumentar el contraste se pueden usar tinciones o modificar los microscopios.

- **La Resolución**

El poder de resolución es la menor distancia que hay entre dos objetos que se pueden distinguir uno de otro. Depende del aumento, de la longitud de onda de la luz y del índice de refracción del material de la lente. La microscopia electrónica modifica la longitud de onda por un haz de electrones, aumentando el poder de resolución. El aceite de inmersión también lo aumenta, al tener un índice de refracción parecido al de la lente, dejando pasar mayor número de rayos de luz.

Apertura numérica: Depende del tamaño de la lente y del aceite.

$$AN = n \times \sin \theta$$

n = índice de refracción; θ = mitad del ángulo del cono de luz que entra en el objetivo

d = distancia mínima entre dos puntos para diferenciarlos uno del otro:

$$D = \lambda / 2 AN$$

Ejemplo: ¿Cuál es d , si usamos luz azul de $\lambda = 450\text{nm}$ y sabemos que $AN = 0,65$?

Modificaciones al microscopio:

Los cambios que se le pueden hacer al microscopio son los siguientes: Campo oscuro, contraste de fase, contraste diferencial de interferencia y fluorescencia.

- **Campo oscuro:** Se proyecta una luz muy potente que no llega al objetivo directamente. Solo llega la luz que ha sido refractada por los especímenes de la muestra. Este efecto se consigue con un disco opaco con una rendija que deja pasar la luz. Se usa para ver movilidad, dado que no se puede usar tinciones, las cuales matan al microorganismo.
- **Contraste de fase:** Se hace una doble modificación, al introducirse un disco opaco parecido al del campo oscuro, pero que si deja pasar la luz al objetivo (disco de fase) y añadiendo también un objetivo modificado que lleva un anillo de fase. De esta manera hay un desfase entre la luz que atraviesa el microorganismo y la luz que no lo hace. Cuando los dos rayos de luz se unen hay una “interferencia destructiva”, pudiendo observarse un fondo claro con los microorganismos en oscuro.
- **Microscopia de Normansky:** No tiene los objetivos modificados con los anillos de fase, sino que tiene unos prismas dando “volumen” a la imagen.
- **Microscopia de fluorescencia:** No se ven las células vivas porque se tiñen y se fijan, lo que las mata. La fluorescencia aprovecha la capacidad de algunas moléculas en absorber longitudes de onda corta y reflejar longitudes de onda mayor. Se usan unos filtros excitadores que transmiten un tipo de longitud de onda específica. Las muestras que transmiten fluorescencia son las metanógenas o aquellos microorganismos con pigmentos o clorofila, que sirven de fluoróforo. Se usa en ecología microbiana y en microbiología diagnóstica.

Tinciones y preparaciones:

Las preparaciones en fresco son simples: Se pone una gota con microorganismos en un portaobjetos, se cubren con un “cubre” y se observan directamente al microscopio óptico. La preparación en gota pendiente,

que es ligeramente diferente, usa un cubre que deja espacio para la gota y no la aplasta (extiende).

Cualquier colorante que se use para tinciones tiene estas características:

- Está formado por compuestos con dobles enlaces conjugados
- Puede unirse a las células mediante enlaces iónicos, covalentes o hidrofóbicos.

Hay dos tipos de covalentes: Ácidos y básicos

Covalentes Ácidos: Fucsina Ácida, Eosina, Rosa de bengala

Covalentes Básicos: Azul de metileno, Fucsina básica, Violeta de genciana, Verde malaquita, Safranina

Los colorantes básicos están cargados positivamente, luego se unen a proteínas y ácidos nucleicos. Es la más utilizada en bacteriología. Además, las tinciones pueden ser simples, diferenciales y específicas:

- **Tinción Simple:** Se usa un único colorante. Antes de teñir, hay que fijar la muestra. La fijación puede ser por calor (frotis) o química (se añade un compuesto como el formaldehído, ácido smico o glutaraldehído) y después se deja reposar durante un tiempo a temperatura fría o al aire libre. Se añade finalmente el colorante y se deja actuar. Después se lava el exceso de colorante y se pone un cubre. De esta manera la muestra ya está lista para ser observada al microscopio.
- **Tinción Diferencial:** Separa los microorganismos según sus propiedades para con la tinción. Tiene dos fases: la primera es de fijación simple, y luego viene la de contraste, para teñir las células que no se hayan teñido con el primer colorante.

3) Tinción de Gram: Es un tipo de tinción diferencial. Se distinguen dos tipos de microorganismos: Las Gram negativas y las Gram positivas. Se tiñe de positivo o negativo dependiendo de la pared celular. Las gram positivas tienen pared celular con una capa de peptidoglicanos muy gruesa. Por el contrario, las Gram negativas tienen pared celular de peptidocicanos más reducida y recubierta de una membrana plasmática externa.

La tinción de Gram se realiza de la siguiente manera:

- Fijación
- Tinción Cristalvioleta (que tiñe solo las Gram positivas)
- Iodo (lugol) que fija el colorante en los microorganismos
- Se lava la muestra con etanol y luego con agua
- Se tiñe con safranina, que tiñe a las Gram negativas
- Se lava con agua

4) La tinción Ácido alcohol resistente: Se usa para las micobacterias que producen enfermedades como la tuberculosis o la lepra. Estas bacterias tienen una pared muy resistente, por lo que lo primero que debe hacerse es:

- Un frotis
- Teñir con Fucsina Básica, que se debe calentar para que adquiera el colorante y tiñe las micobacterias
- Se lava con ácido clorhídrico (HCl) y alcohol
- Se tiñe con azul de metileno normal, que tiñe el resto de las células y microorganismos.

5) Tinciones Específicas: Incrementan el contraste de células microbianas y revelan estructuras particulares como las endosporas (Bacillus y Clostridium), así como flagelos y capsulas.

La tinción de las endosporas se realiza como sigue:

- Frotis
- Se cubre con papel con verde malaquita y se calienta (tiñe endosporas)
- Se usa otro colorante: Sefanina, que tiñe el resto de células.

6) Tinción de Flagelos:

- Fijar con formol (sin calor)
- Tratar con Ácido tánico, que ayuda a la tinción a adherirse
- Teñir con rosanilina (no se verá el movimiento de los flagelos al estar fijados)

7) Tinción negativa de células de microorganismos patógenos:

- Añadir tinta china a la mezcla de bacterias
- Extender sobre un portaobjetos
- Secar al aire

La Microscopia electrónica:

En la microscopia electrónica se proyecta un haz de electrones (guiado por electroimanes). Las muestras se ven a través de una pantalla. Se usa para ver las estructuras internas o ultraestructuras en el caso del Microscopio electrónico de transmisión (MET), mientras que al microscopio electrónico de barrido (MEB) se observa una visión tridimensional del exterior del microorganismo. El microscopio óptico tiene una resolución de unos 200nm, mientras que el microscopio electrónico tiene entre 1 y 200nm. Los aumentos del microscopio electrónico son de x200000 (200 veces mayores que al microscopio óptico). En el MEB la muestra se recubre de oro o platino. El MEB se usa un chorro de electrones primarios que rebotan sobre la muestra (mientras que en el MET el chorro de electrones atraviesa la muestra), con lo que éstos luego inciden en unas pantallas que forman una imagen tridimensional (electrones secundarios). El MET refleja la visión en una pantalla fluorescente. No se usan colorantes, sino metales pesados, y se coloca la muestra en una rejilla de cobre (para dejar pasar el chorro de electrones).

El MET tiene la variante de la criofractura, que consiste en congelar y romper el microorganismo para ver las estructuras del interior celular. En el proceso de preparación, se congela el microorganismo a -196°C, se introduce en una cámara al vacío y se calienta hasta los -100°C. Una vez a esa temperatura se fractura la muestra al azar con una cuchilla que también está a la misma temperatura. De este modo quedan a la vista los orgánulos del interior. Éstos se recubren con un polvo, mezcla de platino y carbono, quedando sobre las estructuras expuestas. Se elimina el compuesto orgánico de la célula y se observa de carbono y platino al MET. Por tanto, mediante la criofractura, no se observa la muestra directamente, sino el molde de platino y carbono.

Tema 3: Medios de cultivo, Esterilización y Métodos de siembra

Para empezar se mira la muestra al microscopio, viendo la forma, el movimiento, el tamaño, etc. De los microorganismos. Se puede ver también si se trata de organismos Gram positivos o Gram negativos. Un medio de cultivo es una mezcla equilibrada de nutrientes, que en concentración adecuada y en condiciones físicas óptimas de temperatura, presión, pH, etc. Permiten un buen crecimiento de los microorganismos. Tienen una base mineral, fuente de Carbono (C), Nitrógeno (N), Sulfuro (S), etc. Y a veces factores de crecimiento (como las vitaminas).

Tipos de medios de cultivo:

-Medios definidos: Son aquellos de los cuales se conoce su composición química exacta, preparada a partir de compuestos químicos puros. Dan resultados reproducibles en laboratorio.

-Medios complejos o indefinidos: Son aquellos en los que se desconoce la composición química exacta, porque han sido producidos a partir de extractos naturales (por ejemplo carne, zumos, levaduras, sojas, etc.).

También se les denomina caldos. Se pueden solidificar añadiéndoles agar.

-Medios selectivos: Favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos suprimiendo el crecimiento de otros. Se hacen a partir de un medio de mezcla compleja. Por ejemplo, el agar sulfito de bismuto, que permite aislar *Salmonella typhi* (Gram negativa).

-Medios diferenciales: Identifican colonias de un microorganismo. Permiten la identificación tentativa según sus características biológicas. Por ejemplo el “agar sangre” contiene sangre y se utiliza para determinar microorganismos hemolíticos (que rompen las células sanguíneas), por ejemplo el *Streptococcus pyogenes*, de modo que alrededor de donde crecen se crean zonas blancas.

-Medios de enriquecimiento: Se aísla un tipo particular de microorganismo presente en pequeñas cantidades a partir de una población mixta de gran tamaño. Este medio es muy específico para cada microorganismo.

Métodos físicos para el control microbiano:

Con la esterilización (1) se matan todos los microorganismos incluidas las esporas. Un agente antiséptico (2) elimina los microorganismos patógenos y un desinfectante (3) elimina los microorganismos, pero solo se usa sobre superficies inanimadas.

• La esterilización:

-Por calor: Puede ser por calor húmedo o seco. En la esterilización por calor húmedo se usa vapor de agua. Se calienta éste a 121 C durante 20 minutos y en una atmósfera de sobrepresión, sin que llegue a hervir. Estas condiciones se consiguen en un “autoclave” que es similar a un lavaplatos especializado. Gracias a estas condiciones, los microorganismos se desnaturalizan y son todos eliminados, incluidas sus esporas. No deja residuos tóxicos ni deteriora el material esterilizado. Finalmente es un método económico y rápido. Por contra, este método no permite esterilizar compuestos lábiles al calor (como vitaminas o antib ticos) y tampoco los instrumentos metálicos.

La esterilización por calor seco se crea en estufas que alcanzan temperaturas entre 120 C y 180 C y se aplican durante más tiempo. Por ejemplo, a 140 C la duración es de 5 horas, a 160 C son 2 horas, etc. Este método se puede usar para los compuestos en polvo, sustancias viscosas, vidrios e instrumentos metálicos que no pueden esterilizarse por calor húmedo.

-Por Agentes químicos: Pueden ser de tres tipos diferentes. No se usan para esterilizar medios porque pueden quedar residuos. Su efectividad depende de la concentración y del tiempo de actuación.

- **Antisépticos:** Alcoholes. Dañan las membranas plasmáticas y desnaturalizan las proteínas. Se usan en concentraciones al 30-70%. También se usa el agua oxigenada (H₂O₂), que es un antiséptico débil con capacidad oxidante y que forma radicales libres. Se usa para desinfectar superficies, recipientes, etc.
- **Desinfectantes y esterilizantes (dentro de los agentes químicos):** Se usan para limpiar zonas y superficies. Actúan sobre bacterias y esporas. Por ejemplo, la lejía o el óxido de etileno, se usan para esterilizar gaseosamente en la industria farmacéutica. Pueden ser explosivos.

-Filtración: Se usan unas membranas de celulosa con poros. No retienen virus ni micoplasmas. Se usan para esterilizar emulsiones oleosas y soluciones termolábiles.

Métodos de Siembra:

El medio debe estar esterilizado. Todo el proceso se hace cerca de un mechero para que no se contamine el medio. Se quema el asa de siembra y cerca de la mecha se abre el tubo y se coge la muestra para depositarla en el medio de siembra (placa de petri).

-Método de aislamiento por siembra por estrías en placa: Se quema el asa de siembra y se hace un zig-zag en el agar de la placa. Se vuelve a hacer arrastrando parte de los microorganismos anteriormente depositados. Con el asa de siembra se añaden los microorganismos y se separan en diferentes medios de siembra (se añaden colonias).

-Técnica de siembra en profundidad: Se hacen diluciones previas y se siembran las diluciones más altas. En cada nuevo cultivo se pasa solamente un 10% del anterior, de modo que se va diluyendo la concentración de microorganismos.

Conservación de cultivos bacterianos:

- **Refrigeración:** A 4°C. No se mantienen durante mucho tiempo, apenas una o dos semanas.
- **Ultracongelación:** A -50°C/ -90°C o a -196°C. Se suspenden los microorganismos del cultivo en un preservante que ayuda a que no se dañen las células. Estos preservantes pueden ser Glicerol, leche en polvo, etc.).
- **Liofilización:** Se congela el medio a una temperatura de entre -20°C y -70°C y se deshidratan con vacío.
- **Colecciones de cultivo tipo:** Pertenecen al gobierno. Contienen una muestra de todos los microorganismos conocidos o al menos los más importantes y están a disposición de los investigadores que pueden solicitar una muestra de las mismas.

El Crecimiento celular:

El incremento en el número de células de un cultivo se produce normalmente por fisión binaria (bipartición). Durante el proceso se duplica todo el contenido de la célula y empieza a crear septo que acabará por separar las dos células hijas.

La gemación (en levaduras) es una separación en la que la célula hija aparece como un grano en la pared celular y que va aumentando de tamaño hasta finalmente escindirse.

El tiempo requerido para esta fisión binaria depende de dos factores fundamentales: Los nutrientes disponibles y los factores genéticos.

El ciclo de crecimiento de poblaciones: Se estudia analizando la curva de crecimiento de un cultivo microbiano (cultivo discontinuo o en BATCH). La curva resultante tiene siempre 4 fases claramente diferenciadas: Latencia, crecimiento exponencial, fase estacionaria y muerte.

El crecimiento de poblaciones se determina por el tiempo de duplicación o tiempo de generación. Es el tiempo requerido para duplicarse una población de células:

A partir de una sola célula, el crecimiento es $N = 2^n$

$$N(t) = N_0 \times 2^n$$

$$\log N(t) = \log N_0 + n \log 2$$

$$n = (\log N(t) - \log N_0) / \log 2$$

La velocidad de crecimiento viene dada por $K = n/t$

Y el tiempo de generación es $g = 1/K$

Ejercicio: Supongamos que un cultivo aumenta de 10^3 a 10^9 células en 10 horas, hallar K y g.

$$k = (\log 10^9 - \log 10^3) / \log 2 \times 10 = 6/3,01 = 2 \text{ generaciones por hora aprox.}$$

$$g = 1/2 = 0,5 = 30 \text{ minutos /generación}$$

El cultivo continuo (Quimiostato): Consta de un reservorio, un recipiente de cultivo, una bomba peristáltica y un sistema de desagüe. Se usa sobre todo en la industria para fabricar etanol, cerveza, etc.

Consiste en dejar pasar los nutrientes desde el reservorio hasta el recipiente de cultivo de forma continua para que el alimento nunca se agote, pero la población se mantenga estable. Por el desagüe se eliminan los residuos de la población, para que esta no se muera, y este residuo normalmente es el producto deseado (alcohol, etc.)

Efecto de los Factores ambientales:

- **La temperatura:** Las temperaturas mínimas, máximas y óptimas reciben el nombre de temperaturas cardinales. Las bacterias se dividen en base a la temperatura como bacterias Psicrófilas, Mesófilas o Termófilas:
 - **Psicrófilas:** Se desarrollan a temperaturas bajas, siendo la mínima los 0°C, aunque la óptima se encuentra por debajo de los 15°C y la máxima no supera los 20°C. Además de los Psicrófilos, también existen los microorganismos Psicrotolerantes, que pueden soportar las temperaturas bajas, aunque sus temperaturas óptimas están por encima de los 20°C. Están muy extendidos y son fruto de la adaptación (las enzimas activas a bajas temperaturas tienen mayor cantidad de alfa hélices que de láminas Beta, etc.)
 - **Mesófilas:** La mayoría de los microorganismos son mesófilos, incluidos los que causan enfermedades en el hombre. Sus temperaturas mínimas oscilan entre los 15-20°C, sus óptimas entre los 20-45°C y sus máximas no sobrepasan los 45°C.
 - **Termófilas:** La mayoría de ellos son bacterias, aunque también hay algunos hongos y algas. Las temperaturas óptimas están entre los 45-60°C y las máximas no sobrepasan los 80°C.
 - **Hipertermófilas:** Viven a temperaturas superiores a 80°C y solo pertenecen a las arqueas. Sus hábitats habituales son el compost, los fardos de heno, las tuberías de agua caliente, las zonas volcánicas, las fumarolas hidrotermales y los fondos oceánicos. Su adaptación viene dada por una mayor cantidad de ácidos grasos saturados y su membrana celular carente de ácidos grasos. Un ejemplo de estos microorganismos es el *Thermus aquaticus* (taq polimerasa en acuarios).
- **El PH del medio:** La mayoría de los ambientes naturales tienen un PH alrededor de 5,9. Cuando el PH es superior a 7, se dice que es un medio alcalino, y si es inferior a 7 es un medio ácido.
 - **Microorganismos acidófilos:** Oxidan minerales sulfurados y producen ácido sulfúrico. Bacterias: *Thiobacillus*; Arqueas: *Sulfolobus*.
 - **Alcalófilos:** Se encuentran en suelos altamente carbonatados y lagos bicarbonatados. Producen enzimas de gran interés industrial. Bacterias: *Bacillus*; Arqueas: *Natronbacterias*.
- **Agua y presión osmótica:** La presión osmótica dentro de los microorganismos es mayor que la del exterior. Los microorganismos halófilos son capaces de crecer con presiones osmóticas muy grandes. Esto lo hacen acumulando en su interior solutos compatibles (pueden ser iones potasio, aminoácidos, o disacáridos, etc.) Los solutos compatibles no intervienen en la bioquímica celular, son o bien sintetizados por el organismo o los toman del exterior. La cantidad máxima de solutos compatibles que pueden acumular viene determinada genéticamente. Hay halófilos moderados (bacterias, arqueas y hongos) y extremófilos (solo arqueas). Los osmófilos son capaces de vivir en concentraciones muy altas de azúcares y los xerófilos son capaces de vivir sin apenas agua en ambientes muy secos.
- **El Oxígeno:** Los microorganismos son aerobios si crecen en presencia de oxígeno, con tensión de oxígeno total. Aquellos microorganismos que son aerobios pero necesitan una tensión de oxígeno menor de la que hay en el aire son microaerófilos. Aquellos que no pueden crecer con oxígeno son los microorganismos anaerobios. Dentro de estos están los microorganismos anaerobios aerotolerantes, que toleran la presencia de oxígeno aunque no lo utilizan, y los microorganismos anaerobios estrictos, que no soportan la presencia de oxígeno.

Los microorganismos anaerobios no pueden eliminar el oxígeno, y por eso no lo usan. En cambio los microorganismos aerobios tienen enzimas como la catalasa (o peroxidasas, superóxido dismutasa, etc.), que ayuda a eliminar el oxígeno de la célula.

Tema 4: Medición del crecimiento

Para medir el crecimiento de microorganismos se usan varios métodos:

Medidas Directas:

- **Contaje total de células:** Se usa una rejilla o unas cámaras especulares. Se coge un volumen determinado y se cuentan directamente las bacterias. Tiene el problema de que solo se puede contar si el crecimiento ha sido abundante. Es también difícil de distinguir las células vivas de las muertas. Finalmente, es difícil si las células son pequeñas.
- **Contaje de viables:** Un viable es una célula capaz de dividirse y crear una colonia. Se usa el método de crecimiento por siembra en profundidad y se cuenta en la última dilución, calculando cuántos microorganismos hay en un mililitro.

Medidas Indirectas:

- **Turbidez:** Las células dispersan la luz que atraviesa una suspensión. Cuanto más células haya, más luz se dispersará. Se usa el espectrofotómetro que mide la densidad óptica.
- **Peso en seco**
- **Actividad metabólica**

Control químico del crecimiento:

Un antimicrobiano es una sustancia química capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo, o bien de destruirlo. Hay dos conceptos que hay que tener claros acerca de estos productos químicos: La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima letal:

- La concentración mínima inhibitoria es la concentración más baja de un fármaco que inhibe el crecimiento de un determinado patógeno. Allí donde no hay crecimiento microbiano se forma un halo de inhibición.
- La concentración mínima letal es la concentración más baja de un fármaco que mata a un determinado patógeno. Un bactericida mata a concentraciones de dos a cuatro veces superiores a las de un inhibidor del crecimiento. Un bacteriostático mata a concentraciones aun mucho mayores.

Los antimicrobianos se clasifican de la siguiente manera:

- **Según su origen:** Puede ser natural, sintético o semisintético, dependiendo de si se elabora o no, o si se modifica en el laboratorio.
- **Según su efecto:** Pueden ser microbicidas (cuando atacan a los microorganismos) y pueden ser bactericidas, viricidas o fungicidas. También pueden ser estáticos, que son los que inhiben el crecimiento de microorganismos, y son los bacteriostáticos, fungistáticos y viristáticos. Por último, los bacteriolíticos matan las bacterias rompiendo su membrana.
- **Según su espectro de actividad:** Que puede ser amplio o corto. Los Gram positivos suelen ser más sensibles a los antimicrobianos.
- **Según su mecanismo de acción:** Están los que inhiben la síntesis de paredes celulares, los que inhiben la síntesis proteica, la síntesis de ácidos nucleicos o los que dañan las membranas celulares. También están los antimetabolitos.

Mecanismos de resistencia:

- Carecer de pared celular: Todos los antibióticos que actúan a este nivel no afectan a los microorganismos sin pared celular.
- Impermeable a antibióticos
- Alteración del antibiótico. Por ejemplo la penicilinasa, que altera la penicilina.
- Modificación de la diana
- Bombeo hacia el exterior del antibiótico. Por ejemplo la translocasa, que es la enzima que expulsa el antibiótico de un microorganismo.
- Intercambio genético. Los "plásmidos de resistencia"

Los antifúngicos: Al ser microorganismos eucariotas, para eliminarlos sin matar otras células del medio, se usan micostáticos. El principal esteroide de la membrana celular de los mamíferos es el colesterol, mientras que en los hongos es el ergosterol. La anfotericina B, por ejemplo, inhibe la síntesis de este ergosterol.

Los antivirales: Van directamente a inhibir el ciclo de los virus, ya que es diferente al de los seres vivos y de esta manera no son dañadas otras células. También hay antivirales que alteran la síntesis de ácidos nucleicos del virus.

Tema 5: Estructuras Celulares

• La membrana plasmática:

La membrana es de estructura bilipídica en la que están incluidas las proteínas con diversas funciones. La unión de los ácidos grasos al glicerol en bacterias y eucariotas es de tipo éster, mientras que en arqueas es de tipo éter. No hay ácidos grasos en la membrana plasmática de las arqueas. En arqueas son moléculas carbonatadas de tipo isopreno. La estructura del fosfolípido es de diéter de glicerol. Si se forma una monocapa lipídica se le llama tetraéter de glicerol.

Los mesosomas son invaginaciones de la membrana plasmática formando estructuras que pueden parecer orgánulos. Pueden ser vesiculares, tubulares y laminares. Su función no está determinada. Pero se piensa que ayuda a la división celular.

• La pared celular

Está presente en casi todas las bacterias conocidas. Su función principal es proteger a las células de la lisis osmótica. Es la responsable de la forma del microorganismo y muchas de las paredes celulares aumentan la patogenicidad del microorganismo. También protege a la célula de tóxicos.

En la tinción de Gram, los Gram positivos indicaban la presencia de una pared celular más gruesa de peptidoglicanos. Los Gram negativos tienen una capa más pequeña de peptidoglicanos entre la pared celular y la membrana plasmática.

El peptidoglicano consiste en una cadena larga glucosídica de azúcares cuyas unidades están formadas por el N-acetilmurámico (NAM) y la N-acetil-glucosamina (NAG). Al N-acetil-murámico se le unen unos aminoácidos específicos de cada microorganismo, y al conjunto de aminoácidos, NAM y NAG se le llama "tetrapeptido de glicano".

Varía la composición de los aminoácidos y del número de uniones entre las diferentes cadenas. Entre una cadena y la paralela se producen enlaces peptídicos entre el último aminoácido de una cadena con el

penúltimo de la otra cadena. La unión entre los aminoácidos es directa.

En Gram positivos hay otros aminoácidos como la L-homoserina, la L-diaminobutírico, L-ornitina y la L-lisina.

La unión entre aminoácidos no es directa, sino que se unen mediante puentes de aminoácidos. Por ejemplo y muy común es el de 5 glicinas (GLY); o con una Lala; o con 2 alaninas, 3 alaninas o 3 alaninas y una ornitina.

Puede haber hasta 50 capas de peptidoglicanos en los Gram positivos, en comparación con las tres o cuatro capas de las Gram negativas. Además, en Gram positivas hay más uniones entre cadenas de otras capas, mientras que en las Gram negativas las uniones entre aminoácidos se dan solo entre cadenas paralelas. Por ello, la capa de Gram positivas de peptidoglicanos es más fuerte y rígida.

Síntesis de peptidoglicanos:

Se requieren dos transportadores. En el citoplasma se forman todos los componentes del peptidoglicano, unidos al UDP (transportador). Así se unen todos los aminoácidos del péptido y necesitan electrones. La N-acetil-glucosamina se une después formando la UDP-NAM(aa)-NAG. Otro transportador, el Bactoprenol, saca todo este conjunto de la célula al unirse a dos fosfatos.

Otros componentes de la pared celular:

En los Gram positivos también hay ácidos teicoicos unidos covalentemente al NAM o a los ácidos grasos de la membrana plasmática (ácidos lipoteicoicos). Tienen la función de darle carga negativa a la pared celular gracias a la cual se unen cationes importantes para el metabolismo. En Gram negativos puede haber una membrana externa con fosfolípidos similares a los de la membrana plasmática. Exteriormente tienen lipopolisacáridos (LP) que es una capa formada por un lípido A, un CORE y cadenas laterales o antígeno O.

El lípido A son dos moléculas de glucosamina con cadenas de ácidos grasos. El lípido A se introduce en la membrana. El CORE tiene azúcares raros, al igual que la cadena lateral.

La capa externa hace a las Gram negativas menos solubles a detergentes y resistentes a disolventes orgánicos, antibióticos y moléculas hidrofóbicas, y une a cationes divalentes. También constituye la endotoxina que induce a la fiebre, la hipertensión, etc.

En los Gram negativos hay además unas “proteínas de Braun” que unen la membrana externa al peptidoglicano. La membrana externa tiene porinas para dejar pasar las sustancias que necesita. En *E. coli* hay porinas OmpC (hasta 500g/mol), OmpF (hasta 600g/mol) y PhoE (moléculas grandes).

El espacio periplásmico: Es un compartimento acuoso, relleno de un gel periplásmico en el que hay fosfatasa, RNAsas, penicilasas, etc.

Importancia de la pared celular: La pared celular da forma y evita que la célula se rompa por la presión osmótica. Cuando una Gram positiva pierde su pared por causa de la penicilina o por lisozimas, tenemos “protoplasma”. Si es una Gram negativa queda como un esferoplasto. Los esferoplastos y los protoplastos son de utilidad en la investigación.

Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular:

- Fosfomicina: inhibe la formación de N-acetil-murámico
- Tunicamicina: inhibe la translocasa que cede NAM unido a UDP y lo pasa a bactoprenol
- Bacitracina: impide la regeneración del bactoprenol
- Penicilina: inhibe la unión entre aminoácidos de distintas cadenas
- Lisocima: inhibe la unión entre NAM y NAG

Pared de las arqueas:

1. En arqueas metanógenas: No existe peptidoglicano sino pseudopeptidoglicano:

NAG-N-acetil-talosaminourónico. Se unen mediante enlaces Beta (1-3). Al ser otro tipo de enlace, no son sensibles a la lisozima.

2. En el resto de arqueas: En lugar del peptidoglicano tienen una capa S de glicoproteínas, de estructura hexagonal. En el caso de los géneros *Methanosarcina* y *Halococcus*, la capa S está rodeada de otro polímero, que es la metanocondroitina, formada por subunidades de N-acetil-galactosamina, ácido glucurónico, glucosa y manosa. El género *Thermoplasma* son las únicas arqueas que no poseen pared celular.

Diversidad del peptidoglicano: Solo se presenta en el dominio Bacteria. En las paredes de los dominios Arquea y Eucaria no se han encontrado NAM ni DAP. Todas las bacterias tienen DAP, en todas las Gram negativas y en algunas Gram positivas. La presencia de dos aminoácidos con configuración D (D-alamina y D-glucosamina). Hay 100 tipos diferentes de peptidoglicanos.

3. El glicocalix

El glicocalix está formado por polisacáridos. Si es grueso y rígido se denomina capsula, si es delgada se le denomina capa mucosa. Para verlo se usa una tinta china como tinte. Tiene como función la fijación o adherencia que puede ser sobre soportes inertes o sobre sustratos vivos. Si es a sustratos inertes, se forman microcolonias de la misma especie, o consorcios de diferentes especies. Si se unen a sustratos vivos actúan como adhesinas. Por ejemplo las colonias de bacterias del intestino; aunque se hacen resistentes al sistema inmune.

Finalmente, otra función del Glicocalix es la protección frente a la fagocitosis. Por ejemplo en la neumonía.

Tema 6: El Citoplasma

En el citoplasma procariótico no hay orgánulos. Está formado en su mayor parte por agua, en la que están disueltas algunas sustancias. También hay material genético, ribosomas y en algunos casos, cuerpos de inclusión.

- **Cuerpos de inclusión:** Son estructuras internas de algunos microorganismos con función de almacenar electrones o de reserva para la construcción de macromoléculas. La mayor parte están rodeados de una membrana de lípidos que no es parecida a la membrana plasmática.

Hay diferentes tipos:

- **Orgánulos:** almacenan carbón, como aquellos formados por glucógeno; o por hidroxibutilato. El glucógeno es un polímero de glucosas unidas con enlace Beta (1-4) formando cadenas ramificadas mediante enlaces Alfa (1-6) visibles a microscopía electrónica. Los PHB (polihidroxibutilato) son subunidades de hidroxibutilato que se unen formando largas cadenas. El PHB está en arqueas y bacterias, pero no en eucariotas.

- **Magnetosomas:** Son partículas de hierro (Fe), que el microorganismo convierte en magnetita. Lo fabrican los microorganismos acuáticos y favorece que los mismos encuentren oxígeno, ya que son microaerófilos.

- **Vacuolas de gas:** Son responsables de la flotabilidad de las células. Se da en microorganismos de medios acuáticos para colocarse a mayor altura, sobre todo en células fotosintéticas. Estas vacuolas tienen forma cilíndrica.

- **Endosporas:** Son estructuras de resistencia. Se dan en *Bacillus* y en *Clostridium* (y *Spirosarcina*). Las esporas se forman cuando la concentración de nutrientes es muy baja, cuando hay poca humedad, etc. A una célula con una espora en su interior se le llama esporangio. Más adelante dejará libre la endospora, que puede aguantar mucho tiempo y solo se eliminan por calor extremo. Hay varios tipos:
a) Según su diámetro relativo a la célula madre pueden ser:
- Deformantes: Cuando la endospora es mayor que la célula, de modo que la deforma, quedando el esporangio en forma de huso o de palillo de tambor.
- No deformante

b) Según su localización dentro del esporangio puede ser:

- Terminal
- Subterminal
- Central

La espora está constituida por una serie de capas. La más externa es el esporangio, formado por proteínas, polisacáridos y lípidos. Después están las cubiertas de la espora, formadas por capas de proteínas, fundamentalmente queratina. Finalmente se encuentra el cártex (peptidoglicano) que rodea el core o protoplasto, que contiene lo mismo que la célula madre.

Las proteínas SASP los defiende de las radiaciones, especialmente la Ultravioleta (UV).

Formación de una Espora:

Primero se produce una división celular, dando lugar a una célula grande y otra pequeña. Luego la célula grande envuelve a la célula pequeña. Formando una proespora, a partir de la cual se forman las estructuras celulares hasta que tenemos una espora en el interior de una célula.

El ácido dipicolínico se acumula en el protoplasto de la espora, además de iones Calcio (Ca^{2+}), que se unen al ácido y que alcanzan hasta el 10% en peso seco de la espora. Las esporas están deshidratadas, con apenas un 15% de agua y con todo ello la espora logra hacerse más resistente. Cuando se ha formado la espora, la célula vegetativa se rompe dejando libre la espora.

Algunos microorganismos (*Bacillus thuringiensis*) a la vez que forman la espora, van acumulando una proteína (CRY) a la que denominan “cuerpos parasporales” y que son unas toxinas insecticidas que actúan específicamente sobre larvas de determinados insectos como las mariposas, escarabajos o moscas. El mecanismo de acción es el de esparcirlos por los campos de cultivo para que las larvas se los coman y se activen las proteínas en el interior de las mismas debido al pH elevado. Estas proteínas inducen un cambio en la permeabilidad del intestino de la larva, con lo que la larva muere. La espora germina dando una espora vegetativa que se alimenta de la larva muerta.

Los cuerpos parasporales se usan para la agricultura ecológica; la biotecnología (las plantas que tienen en su interior el gen del *Bacillus thuringiensis* se vuelven resistentes a los insectos), etc.

Germinación de las endosporas:

1. Preactivación: Se erosionan las cubiertas de la espora por el envejecimiento de la misma. De modo artificial se pueden erosionar calentándolas, con radiaciones ionizantes o a pH bajos.
2. Activación: Es una etapa reversible. Entra agua en el protoplasto, diluyendo los compuestos que hay en su interior y perdiendo así su resistencia al calor.
3. Germinación: Es ya irreversible. Hay un metabolismo endógeno (no necesita adquirir compuestos del exterior) en el que las SASP se hidrolizan y los aminoácidos utilizan la célula para formar nuevas proteínas. Se pierden el ácido dipicolínico y los iones de Calcio (Ca^{2+}) y empieza la transcripción de genes.
4. Crecimiento: La célula madura sintetiza ADN, crece, etc. Usando las paredes de la espora para formar sus propias paredes. La célula vegetativa sale rompiendo finalmente las cubiertas.

Tema 7: Apéndices y Movimiento bacteriano

1. Las Fimbrias

La mayor parte de las Gram negativas tienen fimbrias. Son como “pelitos” que rodean a las células. Sólo son observables al microscopio electrónico. Están formadas por una proteína (fimbrina) que forma estructuras helicoidales dejando un hueco en el centro. Tiene como función unirse a superficies sólidas. Un tipo de fimbrias son los “pili”, que son muy numerosos (de 1 a 10 por célula). Otros son los pelos

sexuales, que unen dos microorganismos para permitir el intercambio genético mediante conjugación. Las fimbrias no intervienen en el movimiento celular.

2. Movimiento

Hay varios tipos de movimiento según sea en medios líquidos o en superficies sólidas. En medio líquido se dan las siguientes:

a) Movimiento flagelar cilíndrico:

Los flagelos le ayudan a impulsarse en el líquido. El número de flagelos varía, igual que su distribución, habiendo distribución flagelar polar (monotrica, con solo un flagelo; lofotrica, con varios flagelos en un polo; anfitrica, con un flagelo en cada polo; o varios flagelos en cada polo), o distribución peritrica, cuando los flagelos no salen de los polos, como en el caso de *E. coli*.

La estructura de un flagelo: Se distinguen tres zonas diferenciadas: El cuerpo basal, que está en el interior celular; el gáudio que actúa como bisagra uniendo el cuerpo basal con el filamento; y el filamento.

El cuerpo basal: Se encuentra en el interior celular, constituido por anillos unidos por una varilla. Están los anillos C, SM, P y L en los microorganismos Gram negativos; mientras que en los microorganismos Gram positivos se encuentran los anillos C y SM. La flagelina y la fimbria se disponen de una manera helicoidal con un hueco en el centro que es el filamento. El gáudio sirve para direccionar el movimiento del flagelo.

En *E. coli* la distribución es peritrica. Los flagelos pueden rotar a favor o en contra de las agujas del reloj. Cuando giran en contra de las agujas del reloj, la célula avanza. Si gira a favor, aunque solo sea uno de los flagelos, la célula se voltea (parándose y cambiando de dirección). Los microorganismos detectan las fluctuaciones de las sustancias y modifican su movimiento para acercarse si son nutrientes o alejarse si son sustancias tóxicas. Los microorganismos también se mueven atendiendo a factores físico-químicos como la radiación luminosa, el oxígeno o el potencial redox. También detecta interacciones célula-célula. Todos estos movimientos son las "taxias" (quimiotaxia, aerotaxia, fototaxia, magnetotaxia, etc.).

En la quimiotaxia están incluidas proteínas de la quimiotaxia, receptoras de restos metilo MCP's. En *E. coli* hay 4 MCP's: CTsr- receptor de serina; Tar- detector aspartático; Trg- receptor de la ribosa, glucosa y galactosa; y Tap- receptor para diptidos. Todas las MCP's son proteínas transmembranas y se encargan de detectar estímulos externos y trasladar la señal al citoplasma mediante un sistema de traducción de señales.

La Traducción de señales: Ocurre gracias a que hay un conjunto de proteínas Che (Che A, Che W, Che Y, Che R, CheB y Che Z). Las MCP's pueden estar en dos estados conformacionales.

- En uno de ellos, interacciona con Che W, que a su vez interacciona con Che A (quinasa), que se fosforila y fosforila a la Che Y que una vez fosforilada interacciona con Fli II (del motor flagelar) y hace que el flagelo gire a favor de las agujas del reloj.

- En el otro estado conformacional, la MCP no interacciona con Che W, por lo que es el estado relajado en el que el flagelo gira en contra de reloj.

Si se une un atrayente a la MCP, la célula camina.

La Che R añade continuamente grupos metilo a MCP hasta que el grado de metilación cambia el estado conformacional de la MCP, soltándose el atrayente y pasando a otro estado, lo que le permite volver a unirse a Che W, saltando la célula.

La Che B está fosforilada por Che A y elimina los grupos metilo que introduce Che R, completando el ciclo.

En la distribución polar (*Sinorhizobium meliloti*), los flagelos giran en solo un sentido. Si quieren girar, cada flagelo gira a distinta velocidad. En *Rhodobacter sphaeroides* (distribución polar monotrica), los flagelos también giran en un solo sentido, pero para girar hace un ovillo con el flagelo y deja que se modifique la dirección aleatoriamente por la inercia.

En la aerotaxia (*E. coli*) hay una proteína sensora Aer en el citoplasma bacteriano. Unida a ella hay dos moléculas de Flavin adenin dinucleótido (FAD), que interviene en el transporte de electrones. Se modifica su configuración, pudiendo interaccionar con Che.

En la fototaxia (*E. coli*) hay una serie de proteínas que perciben la luz y que actúan igual que los anteriores detectores.

En la magnetotaxia, las bacterias que producen magnetosomas se mueven siguiendo el campo magnético terrestre. Los magnetosomas tienen diversas formas; se pueden unir en agrupaciones, están rodeados de una membrana y su función es llevar a las células acuáticas a zonas donde la concentración de oxígeno es la adecuada.

b) El movimiento axial:

Es producido por el giro del microorganismo. Como consecuencia del movimiento de flagelos internos (en la zona del periplagio). Se da en espiroquetas, que son las causantes de la sífilis, las fiebres recurrentes, la enfermedad de Lyme, la leptospirosis, etc.

Movimientos sobre superficies sólidas, se dan los siguientes:

- **Flagelar o movimiento de enjambre (swarming):** Se aprecia un movimiento en oleadas ya que los microorganismos se estorban entre sí y emigran para generar nuevas poblaciones. *Proteus mirabilis* es un microorganismo flagelado. Cuando emigra se elonga y se interflagela (crea nuevos flagelos). Los diferentes individuos se juntan y se rodean de un polisacárido que les permite moverse mejor por superficies sólidas. Cuando llegan a una zona menos poblada se separan (consolidación) y generan una nueva población.
- **Movimiento a saltos (twitching) con pilis de tipo IV:** La célula produce su pili, que se une a la superficie por su extremo, para luego contraerse y arrastrar el microorganismo. Luego lo vuelve a estirar y repite el proceso. Dependiendo de la dirección del movimiento, los pilis salen en un lado u otro de la célula.
- **Movimiento social de *Mixococcus xanthus*:** Todas las células se unen unas con otras formando estructuras tridimensionales complejas en las que cada célula se especializa para formar tallos o cuerpos fructíferos (que albergan mixoesporas). Cuando se forman completamente, los sacos revientan y las esporas caen y germinan más o menos lejos de la población inicial.
- **Movimiento deslizante (gliding):** No requieren ni flagelos ni pilis y están muy extendido entre los microorganismos. Estos se envuelven en unos lámpidos que permiten el movimiento en superficies sólidas, similar a como lo haría un caracol.

Tema 8: La expresión génica

El dogma de la biología molecular es la Replicación, la Transcripción y la Traducción.

Un gen es un segmento o secuencia de ADN que codifica para proteínas. Un Operón es el conjunto de genes bacterianos que se cotranscriben al estar relacionados.

Síntesis del RNA:

-RNA polimerasa:

Consta de cuatro subunidades: alfa 2, Beta, Beta', y Sigma. Estas subunidades se componen de sustratos de UTP, GTP, ATP y CTP. La RNA polimerasa de eucariotas y arqueas tiene más subunidades y son más complejas, pero la estructura es similar.

Proceso de Transcripción: Consta de tres fases, la iniciación, la elongación y la terminación.

-La iniciación: Unos promotores como la caja Tata (TATAAT) en posición -10 y la TTACA en posición -35 son promotores fuertes. Cuanto menos se parezcan estos promotores al ideal, más débil es el promotor. Si es muy fuerte, cada dos segundos se transcribe, mientras que cuanto más alejado del consenso, varía la velocidad hasta los dos minutos. La primera base por la que empiezan a transcribirse los genes es una Guanina o una Adenina.

-La elongación: La polimerasa se une a los promotores y se sintetiza una pequeña región de 9 bases (cebador o primer), con lo que empieza la transcripción.

-La terminación: Son secuencias ricas en Guanina y Citosina seguidas de secuencias ricas en Adenina y Timina, ya que son complementarias y pueden formar una horquilla. La transcripción termina con una secuencia de 4 uracilos.

El factor rho actúa como una helicasa. Se une al mRNA y corta la hélice híbrida ADN-RNA.

Antibióticos que inhiben la transcripción:

-Actinomicina D (Streptomyces): Bloquea a la RNA polimerasa. Es quimioterapéutica.

-Rifampicina: Se une a la subunidad Beta.

Adaptación en bacterias:

Cuanto más versátil es un organismo, más información genética contiene. Un microorganismo medio tiene unos 6000 genes, aunque se utilizan solamente de unos 600 a 800. La síntesis de una proteína media tiene un gasto de 3000 ATP's. Los microorganismos tienen que tener un control genético para sintetizar el producto que les es necesario en cada momento e inhibir el que no necesitan.

El control genético: El control genético más común y con menor gasto energético es en la transcripción. Los genes tienen operones y regiones promotoras. Cerca del promotor hay un gen regulador y un operador:

-Gen regulador proteína reguladora represor (control negativo) o activador (control positivo). Ambos pueden ser reprimibles o inducibles.

El control negativo inducible se da cuando la proteína se une al operador y no se produce la síntesis de ARN. Si se une un inductor, el inducible no se une al operador y si se produce la síntesis de ARN. En el reprimible si se produce la síntesis de ARN pero si hay un correpresor en el medio, este se une al represor y deja de haber síntesis.

Las mutaciones:

El Genotipo son los genes que tiene un microorganismo, mientras que el fenotipo es la expresión de los genes. Las mutaciones son cambios en el genotipo que afectan al fenotipo. Las mutaciones pueden ser:

1. Por sustitución de pares de bases por otras
2. Por delección: Hay un cambio de sentido en un fragmento del ADN
3. Por transposición: Un segmento se traslada de una zona a otra
5. Por duplicación: Se inserta un segmento idéntico al lado del original

Las mutaciones pueden ser espontáneas o inducidas, causadas por tratamientos con agentes mutagénicos químicos, físicos o biológicos. Las espontáneas son muy raras. En bacterias se da una mutación espontánea cada 10^8 .

Los agentes mutagénicos pueden ser químicos (reaccionan con el ADN o con la maquinaria de replicación del ADN, como por ejemplo el 5-bromouracilo, que es un análogo de base y que aparece con Adenina y con Guanina. Otro ejemplo sería el hidroxilamina, que se une a la citosina formando a la

hidroxilamincitosina que puede aparear con la Adenina y con la Guanina. Se cambia entonces un G-C por uno A-T, de forma similar a como actúa el 5-bromouracilo.

Los agentes mutagénicos físicos: Son los UV que forman dímeros de Timina.

Los agentes mutagénicos biológicos son elementos de ADN o ARN responsables de que muchos microorganismos puedan utilizar ciertos nutrientes o sean resistentes a ciertas condiciones.

Los elementos genéticos transponibles son fragmentos de ADN que no son autorreplicativos, sino que necesitan un hospedador. Son capaces de moverse entre el cromosoma y un plásmido y viceversa. Las enzimas que catalizan el proceso son las transposasas. Puede darse (1) un mecanismo replicativo en el que el elemento transponible se replica y queda una copia en la posición original; o (2) un mecanismo de cortar y pegar en el que no se produce la replicación.

Los lugares de inserción dependen del grado de enrollamiento, del grado de metilación o de la susceptibilidad a la transcripción.

Tipos: Hay secuencias de inserción, transposones y los transposones conjugativos.

Las secuencias de inserción están formadas por 1000 pares de bases y en sus extremos tienen secuencias repetidas inversamente. Tienen solo información para que se sintetice la transposasa para que les ayude a saltar. Los transposones son fragmentos más grandes (de 3000 a 20000 pares de bases) que tienen un gen para la transposasa e información genética más específica (por ejemplo, resistencia a antibióticos). Conlleva consecuencias genéticas como la inactivación insercional de un gen (si se introduce en la mitad de un gen, con lo que este puede quedar inactivado); se pueden generar escisiones anómalas que arrastran material genético adyacente al saltar de un lado para otro, etc.

Consecuencias de las mutaciones:

Depende del grado de la mutación y de la importancia que tenga el producto genético para la célula.

Según el grado de la mutación, puede ser silenciosa (se produce lo mismo), sin sentido (da proteínas no funcionales) o mutación por cambio de sentido (proteína defectuosa).

Según la importancia que tenga el producto genético, si la proteína era muy necesaria y ya no se produce (o viceversa), la mutación es letal. La autotofia es que los microorganismos pueden vivir, pero sin sintetizar un aminoácido y morir si no puede adquirirlo del medio.

Tema 9: Genética microbiana

El Nucleoide:

No se encuentra diseminado por el citoplasma, sino que está en una región específica. El ADN no está rodeado por membrana. Hay microorganismos que tienen además plásmidos. El cromosoma procariota está formado por ADN, ARN y proteínas. Normalmente es un solo cromosoma circular, de doble cadena, covalentemente cerrado; dentro de un microorganismo se pueden encontrar copias del genoma bacteriano, a lo que se llama haploide y se da cuando la bacteria crece rápido.

Algunas especies de los géneros *Borrelia* y *Streptomyces* tienen los cromosomas lineales. También hay bacterias con dos o más cromosomas: *Rhodobacter*, *Vibrio*, *Leptospira* y *Brucella* tienen dos cromosomas lineales, *Sinorhizobium melioli* tienen tres cromosomas circulares, *Agrobacterium tumefaciens* tiene un cromosoma circular y otro lineal.

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosómicos con capacidad de autorreplicarse y pueden formar copias de sí mismos de forma independiente. Los plásmidos están compuestos por ADN, y muchos de ellos tienen la capacidad de integrarse en el genoma bacteriano. Para ello debe haber más secuencias de inserción por las que se producen la recombinación entre el plásmido y el cromosoma. Al plásmido integrado en el cromosoma bacteriano se le llama episoma. Tiene un tamaño de 2-1.000 kb. Los plásmidos dependen del número de copias y del control de la replicación. Cuanto más baja el número de copias

más estricto es el control.

Algunos plásmidos se transfieren de un microorganismo a otro, son los plásmidos conjugativos. Estos pueden transferir solo entre cepas de la misma especie o de especies parecidas; otros pueden transferirse a especies muy diferentes. Finalmente hay plásmidos no conjugativos, que no se transfieren a otros microorganismos.

Hay plásmidos de resistencia antibióticos (plásmidos R), a metales pesados y otros tienen información sobre la virulencia (factor F de fertilidad).

Reacciones de transferencia génica:

1. Conjugación: Para que se produzca la transferencia de información, los microorganismos deben estar en contacto físico.

2. Transformación: Se transfiere material genético desnudo.

3. Traducción: Se intercambia la información mediante un virus bacteriófago.

La transferencia es unidireccional y parcial. Una vez en la célula receptora se recombina la información nueva con el genoma. La recombinación puede ser general u homologa, cuando se da en cualquier lugar del cromosoma e intervienen enzimas específicas; o específica, que puede ser conservativo si se requiere cortas secuencias de homología (específico del sitio) o ilegítimo, que es un fenómeno de transposición que depende de un elemento genético transponible.

Endógeno: es el genoma de la célula que recibe la información genética.

Exógeno: Es la porción de material genético que la célula dadora transfiere a la célula receptora.

La conjugación:

Una de las células tiene que tener el factor F (plásmido conjugativo), que se puede encontrar como plásmido independiente, incluido en el cromosoma bacteriano (episomas) o independientemente del cromosoma pero con una porción de información genética del mismo. Es ADN circular de doble cadena, de unas 100 Kb. Se han identificado 60 genes con funciones diferentes.

Los genes *Tra* son 25 genes que forman un operón. Son necesarios para la biosíntesis y ensamblaje de los pelos sexuales.

Las secuencias de Inserción: Permiten la integración del factor F en diferentes lugares del cromosoma.

El factor *ori*:

El factor F tiene una secuencia de inserción para unirse al cromosoma bacteriano formando episomas. Son las Hfr (high frequency of recombination).

Transformación:

Es la captación por parte de una célula receptora de una molécula o fragmento de ADN desnudo y libre en el medio y la incorporación mediante recombinación de este material al cromosoma de la célula.

Puede ser natural o artificial. En el proceso natural, el ADN que está fuera de la célula es de doble cadena, y el ADN que queda dentro es de cadena simple. Una sola molécula de ADN puede producir la transformación, y el número máximo de moléculas de ADN que pueden entrar depende de la cinética de saturación.

Las células deben ser competentes para producir la transformación, es decir, son aquellas que tienen los mecanismos para hacer más permeable la membrana plasmática para que entre el ADN en la célula. Esta competencia depende de la temperatura, del pH, los nutrientes, la densidad celular, etc. Cuando se introduce la cadena de ADN llega un momento en el que no puede funcionar la cadena de ADN de la célula y es la fase de eclipse.

El material que hay fuera de la célula puede estar ahí por la lisis de otras células o por bacterias que expulsan el ADN al medio.

En las Gram positivas, el ADN monocatenario se introduce en la célula mientras la complementaria se degrada simultáneamente. Buenos ejemplos son los *Streptococcus* y *Bacillus*.

En las Gram negativas se pega a la pared una molécula de ADN de doble cadena, pero solo una de las cadenas se introduce en la célula y la otra cadena se degrada en el espacio periplásmico. Se da en

Haemophilus, Neisseria, Roraxella, Acinetobacter, Pseudomonas, Cidmobacterias y Azobacter.

Gram positivas: Son inespecíficas, por lo que captan el ADN del mismo grupo de microorganismos o de otros microorganismos. Solo es capaz de transformar los que se parezcan mucho, aunque se pegue cualquier ADN a la pared celular.

En *Streptococcus pneumoniae*, que es Gram positiva, un FAC (factor activador de la competencia), una vez formadas las células, lo expresan y se unen a unos receptores de membrana que inducen la expresión de genes que traducen 12 proteínas. Una de ellas, la autolisina, es la que hace agujeros en la pared celular y deja al descubierto los sitios de unión al ADN exógeno. Segón entra la cadena de ADN, hay más proteínas que se unen al mismo para que no sean atacados y le ayudan a llegar al cromosoma bacteriano para que pueda unirse a él.

En *Haemophilus influenzae*, que es Gram negativa, el ADN que entra tiene que ser del todo homólogo. La competencia se produce en la fase estacionaria de crecimiento y para que se produzca la transformación necesitan de receptores de membrana, llamados transformasomas, los cuales reconocen una secuencia específica y se produce la entrada de una de las cadenas.

De manera artificial, para hacer las células competentes se le hacen poros con cloruro cálcico en la pared celular y se introduce el ADN en la célula.

Transducción:

Se da por la unión de bacteriófagos a la célula a la que le introduce el ADN. Los bacteriófagos tienen dos fases de "vida". Se unen a sitios específicos de anclaje de la pared celular e introducen el ADN en la bacteria, donde puede seguir dos ciclos:

1. El ciclo lítico, que obliga a la célula a formar nuevos virus en el interior de la célula. Luego esta se rompe, dejando libres los virus. Se da en fagos virulentos.
2. Ciclo lisogénico: El ADN vírico se recombina con el cromosoma bacteriano y se le llama profago. Por agentes externos (como la radiación UV), el fago puede saltar del cromosoma bacteriano, yendo al ciclo lítico. Se da en fagos moderados.

Las células con profago son células lisogénicas. La transducción puede ser generalizada (cuando el fago introduce el material genético y cuando se da el ensamblaje de los componentes del virus -dentro de la célula-, se introduce simultáneamente y por error, material genético de la célula anterior creador del virus, por lo que se da la transferencia genética adicional); o especializada (cuando el profago se introduce en una zona específica en el cromosoma de la célula y arrastra consigo información específica del cromosoma cuando se retira).

Tema 10: Bioenergética:

La célula usa la diferencia de potencial con el exterior para obtener energía. Pueden usar la diferencia de concentración o gradiente de protones (H⁺), sodio o de OH⁻ (Teoría quimiosmática de Mitchell).

Las reacciones de oxidación y reducción son esenciales para la obtención de energía. Las moléculas que se usan para la obtención de energía son ATP, PEP; NADH+H⁺, NADPH + H⁺. El sustrato que se usa debe estar reducido (con electrones de más), para poder oxidarlo, ganar electrones y con ellos ganar energía.

Transporte:

-Transporte pasivo o difuso: Si tenemos una membrana semipermeable y existe una diferencia de concentración entre el exterior y el interior de la célula, esto se regulará para que la diferencia sea la menor o sea nula. Este intercambio con el medio no le conviene a la célula cuando los nutrientes en el exterior escasean. Por ello también usan transporte contra gradiente (y para lo que gastan energía).

-Trabajo osmótico o transporte activo: Es el transporte contra gradiente, que necesita un aporte de electrones y traslocadores. Puede llegar un momento en el que no se pueda introducir más nutrientes dentro

de la célula por saturación.

El uso de un transporte u otro depende del tamaño de las sustancias y de la carga:

- Transporte activo primario: Es aquel que aumenta la fuerza motriz de protones.

-Transporte activo secundario: Hace disminuir la reserva de protones al gastarla para transportar macromoléculas.

- Respiración (transporte primario): Requiere de una cadena transportadora de electrones, un dador y un aceptor. El dador suele ser el $\text{NADH} + \text{H}^+$ y el aceptor puede ser el Oxígeno. Con este mecanismo se crea un gradiente de protones.

- La fotosíntesis (transporte primario): Necesita una proteína que cambie de conformación con la energía lumínica y con ello cambie la conformación de su cofactor. Cuando el cofactor vuelve a su estado normal, impulsa protones al exterior.

- Metabolismo (transporte primario): Elimina los productos del metabolismo. Se acopla la diferencia de concentración del producto del metabolismo con el gradiente de concentración de protones. Se usa este mecanismo de expulsión para producir energía.

-Incorporación de nutrientes contra gradiente (transporte secundario): Se debe impedir la salida de los mismos por difusión simple. Para su adquisición se usa el simporte con protones del exterior, pues se mueven en la misma dirección (hacia el interior de la célula).

-Incorporación de iones (transporte secundario): Igual que en el caso anterior, se usa el gradiente de protones para introducir potasio y otros iones, contra gradiente, lo que supone un gasto de energía en forma de protones. En el caso de iones negativos como el sodio, se da el antiporte (se incorporan protones).

Finalmente, el gradiente de protones también se usa para hacer rotar los flagelos.

Sistemas de transporte:

-El primer sistema es el de la **ATPasa / ATPsintasa**. Es una misma estructura que se encarga de bombear protones con gasto de ATP, o también puede funcionar inversamente produciendo moléculas de ATP a partir de ADP dejando pasar protones del exterior. Es por tanto también un sistema de regulación para el que hacen falta muy pocos genes. Incluso los organismos más simples, con muy poca información genética, tienen esta estructura.

-Translocación de grupos: Se usa el PEP, que se hidroliza para dar piruvato (Pir), que cede energía para fosforilar un enzima. El enzima fosforilado puede fosforilar otro enzima desfosforilándose el mismo. Hay algunos mecanismos que son específicos de sustrato (se fosforila un enzima o no, dependiendo de donde esté localizado). Al fosforilar (activar) una enzima específica, puede dispararse una cascada de señalización: Si no encuentra su sustrato (por ejemplo, la glucosa) y no puede importarlo a la célula, se pone en marcha el AMP cíclico, que va al ADN para que el enzima cambie y sea específico de otro sustrato (sistemas alternativos de obtención de energía).

-Sistemas de translocación ABC: Gracias a tres componentes (uno en el espacio periplásmico, otro en la membrana plasmática y otro en el citoplasma) se favorece la entrada de nutrientes. Se usa para la regulación de entrada de metales y requiere de ATP para romper el enlace de los componentes con el sustrato.

La respiración:

Los seres vivos pueden ser quimiotrofos y fototrofos. Los quimiotrofos pueden ser a su vez quimioheterotrofos o quimioautotrofos y lo mismo con los fototrofos.

Para los quimioheterotrofos, el carbono es a la vez la fuente de energía y la fuente de carbono, mientras que los autotrofos usan el CO₂ como fuente de carbono.

Agentes oxidantes:

- Celulares: NAD⁺ y NADP⁺
- Ambientales: Fe³⁺, NO₃⁻, SO₄²⁻, H₂

Agentes reductores:

- Celulares: NADH + H⁺ y NADP + H⁺
- Ambientales: Fe²⁺, NO₂⁻, S₂⁻, H₂

Lo primero que se debe hacer para poder respirar, es introducir glucosa en la célula, contra gradiente y en simporte con protones del exterior. Luego la glucosa se oxida durante la glucólisis al reaccionar con el NAD⁺. De este modo se obtiene ATP por fosforilación a nivel de sustrato (ADP se transforma en ATP) y la glucosa se oxida a piruvato (Pir). El piruvato a su vez entra en el ciclo de Krebs, quedando oxidado a CO₂ y H₂O. El NADH + H⁺ de la glucólisis y también del ciclo de Krebs luego entran en una cadena transportadora de electrones de la membrana, donde vuelven a ser NAD y donde sueltan los electrones. Estos necesitan un aceptor final, como es el Oxígeno en el caso de los seres humanos, y de esta manera se produce un gradiente de protones.

Este gradiente de protones es el que luego permite toda la actividad bioenergética celular posterior y la obtención de ATP a partir de ADP en las ATP sintasas.

Los aceptores de electrones son agentes oxidantes que el organismo normalmente tiene que adquirir del medio para la obtención de energía. En nuestro caso usamos el oxígeno, que es con el que se obtiene el mayor gradiente de protones y por tanto más energía. Sin embargo, esto no quita que otros organismos usen otros sustratos diferentes de la glucosa.

La Fermentación:

En el caso de la fermentación de la glucosa, se usa el gradiente de protones para la obtención de glucosa en el interior celular. Luego la glucosa pasa por el proceso de la glucólisis, dando 2 moles de ATP por cada mol de glucosa y produciendo Piruvato.

El producto de la glucólisis puede luego expulsarse, expulsando también protones para dar un gradiente de protones. Con esto se obtiene hasta el 30% de la energía de la célula.

Aunque este sistema de obtención de energía parece primitivo y poco eficiente, hay que entender que con la fermentación no se obtiene solo energía, sino que también se obtienen numerosos sustratos necesarios para la actividad celular, como son las cadenas de azúcares, etc, etc.

La Fotosíntesis:

Para la fotosíntesis se necesita una membrana, un centro de reacción (clorofila), y una cadena transportadora de electrones, además de un aparato recolector de luz.

La transferencia de energía hace que la luz se filtre a una sola longitud de onda, que es la que va a poder ser utilizada. Esta luz excita los electrones del centro de reacción, deslocalizándolos. Cuando estos vuelven a su posición original, producen fluorescencia, pero más comúnmente pueden ir a la cadena transportadora de electrones.

En la cadena transportadora, se produce un gradiente de protones. De esta manera se puede obtener ATP

gracias a la ATP sintasa (en un proceso no acoplado). Esto recibe el nombre de fosforilación acíclica. La fosforilación cíclica es aquella en la que los electrones de la cadena transportadora son impulsados en sentido contrario, creando materia orgánica y suponiendo un gasto de energía.

Sistemas de obtención de energía en la evolución:

Gracias a los descubrimientos en micropaleontología sobre cianobacterias del Arcaico-ópaloides, se ha podido comprobar que su antigüedad coincide con la acumulación de oxígeno en la atmósfera. Estos datos han permitido desarrollar la teoría de que los primeros pobladores de la Tierra fueron anaerobios. Una de las hipótesis más fundamentadas sostiene que en el principio existieron unos organismos que vivían en el sustrato (suelo) para protegerse de la fuerte radiación solar. Estos microorganismos además poseían carotenos, pero estos no debían servir para la fotosíntesis aun, sino para más protección frente a la radiación solar.

De aquí, lo más probable es que la vida evolucionase hacia la fotosíntesis anoxigénica, utilizando el caroteno como colector de electrones y desarrollando un centro de reacción, que sería la clorofila. Esto podría coincidir con la aparición de la primera atmósfera terrestre y la atenuación de la radiación solar sobre el planeta.

Más tarde aun llegaría a la fotosíntesis oxigénica, que necesita dos centros de reacción y también agua. Con la fotosíntesis empezó a producirse oxígeno, lo que en aquel entonces no era deseable para los microorganismos que allí vivían y para quienes el oxígeno era tóxico. Para disiparlo, algunos microorganismos empezaron a respirarlo para eliminarlo y para obtener energía.

Actualmente, la concentración de oxígeno en la atmósfera (21%) es muy grande, que es más de lo que necesitan los microorganismos aerobios para vivir y que es una concentración dañina para los microorganismos anaerobios.

Tema 11: Clasificación y filogenia de los Procariotas

Los árboles filogenéticos se suelen hacer por características fenotípicas, sin embargo, es posible hacer cladogramas genotípicos. La evolución, siendo la suma de mutaciones (y transferencia horizontal de genes), puede esquematizarse como un cladograma en el que, comparando las secuencias genéticas se pueda calcular las distancias evolutivas.

Los sistemas eucarióticos se han estudiado a partir de la teoría endosimbiótica de Margulis, que fue confirmada mediante la comparación del ADN mitocondrial y de los cloroplastos con el ARN ribosómico de bacterias aerobias (como lo fueron en su día las mitocondrias) y el de las cianobacterias (a las que pertenecían los cloroplastos).

El ancestro común de todos ellos, LUCA aun no ha sido completamente secuenciado en su ARNr, pero no es sorprendente, teniendo en cuenta que solo se conoce el 1 o 2% de todas las especies procariotas que existen.

Metodología de ecología microbiana:

DGGE: Electroforesis en campo desnaturalizado. Es un proceso de laboratorio que permite averiguar a qué género o especie pertenecen unos determinados microorganismos en base al grado de homología de bases. El ADN, con carga negativa, es colocado sobre un campo electroforético sobre el que se hace pasar una corriente. De esta manera se desnaturaliza el ADN y se separa en bandas que se analizan y secuencian. Repitiendo las pruebas con distintos cebadores de bacterias, arqueas o eucariotas se compara la velocidad de desnaturalización y la disposición de las bandas entre sí y con una base de datos. Cuando tenemos una homología del 97% o superior, podemos decir que se trata de la misma especie, y cuando es superior a 93% podemos afirmar que los microorganismos son del mismo género.

FISH: Cuantificación, saber cuántos microorganismos de una muestra son de una especie específica gracias a una sonda. Se precisa de un microscopio de fluorescencia. La muestra se trata y luego se observa todos los microorganismos que hay en ella. Hibridando la muestra y filtrando la luz se pueden observar solamente aquellos microorganismos que hayan hibridado ya que aparecen en otro color. La cuantificación se establece comparando con los que han hibridado con los del control total que se hizo al principio.

Métodos automatizados para identificar microorganismos:

-Perfil de ácidos grasos: En un cultivo axénico se extraen las membranas de los microorganismos, hidrolizándolas y separándolas con un detergente polar. Se usa luego un cromatograma de bases, obteniendo una gráfica con los ácidos grasos que tienen las membranas del microorganismo, su cantidad y cuáles son. Estos datos se pueden comparar con una base de datos para identificar al organismo (perfil de aminoácidos).

Algo parecido se puede hacer con enzimas de restricción. Se obtiene una especie de código de barras que también se compara con una base de datos. Este método se basa en información genotípica, al contrario de lo que ocurre con el perfil de ácidos grasos, que es una información fenotípica.

Tema 12: Clasificación de los procariotas

• Las bacterias fotosintéticas (diferentes filos):

Filo 1: Las proteobacterias

Filo 2: Las Heliobacterium

Filo 4: Cyanobacterias, Proclorofitas y Cloroplastos

Filo 10: Bacterias verdes del azufre

Filo 13: Bacterias verdes no del azufre

Phylum 1: Proteobacteria:

Son las llamadas bacterias púrpuras o rojas y de las que hay dos tipos: las bacterias rojas del azufre y las bacterias rojas no del azufre.

Todas ellas en general tienen una gran versatilidad de obtención de energía, que puede ser mediante la fotosíntesis o la respiración. Tienen distintos tipos de pigmentación, entre ellas varias bacterioclorofilas y carotenos y poseen un aparato fotosintético lamelar. Como sucede en la mayoría de los microorganismos, son imposibles de clasificar en base a su morfología externa, ya que son muy distintas de una especie a otra.

Las bacterias rojas se clasifican en bacterias rojas del azufre (BRS) y en bacterias rojas no del azufre (BRNS):

Las Bacterias rojas del azufre (BRS) son Gram negativas y utilizan distintos derivados del azufre como poder reductor del CO₂. Se encuentran sobre todo en los lagos meromíticos y tienen una filogenia coherente como grupo (todos son $\hat{I}^3$).

Dos ejemplos son *Ectothiodospora* y *Halorodospira*.

Por su parte, las **bacterias rojas no del azufre (BRNS)** pueden utilizar bajas concentraciones de H₂S y además poseen una versatilidad extrema a la hora de obtener energía, ya que pueden usar la fermentación, la respiración anaerobia y aerobia y la fotosíntesis. Son Fotoheterótrofas, por lo que obtienen la energía de la radiación luminosa, y fijadoras de nitrógeno.

Su cultivo en laboratorio se consigue mediante cultivos de enriquecimiento a base de sales, ácidos grasos, sedimento y luz.

Aunque tienen una filogenia coherente ($\hat{I}^1$ y $\hat{I}^2$), las especies son morfológicamente distintas entre sí y apenas pueden reconocerse.

Phylum 2: Heliobacterium:

Las *Helio bacterium* son un reducido grupo de bacterias Gram positivas de bajo contenido en Guaninas y citosinas en su DNA. Son anaerobios estrictos y su medio de obtención de energía es la fermentación en ausencia de luz. Tienen bacterioclorofila g y producen endosporas ricas en iones de calcio y ácidos dipicolínicos.

Phyllum 4: Cianobacterias, Proclorofitas y Cloroplastos:

Las cianobacterias: Son un grupo grande de bacterias Gram negativas (con peptidoglicanos) y morfológicamente variable. Dependiendo de su estructura, que puede ser unicelular o filamentosa, se subdividen en 5 grupos taxonómicos:

- Unicelulares con fisión binaria
- Unicelulares con fisión múltiple
- Filamentosas con heterocistos
- Filamentosos sin heterocistos
- Ramificados

En general su tamaño oscila entre las 0,5-1 micras hasta las 60 micras. Poseen envolturas celulares y/o exopolisacáridos mucilaginosos y un aparato fotosintético lamelar con dos centros fotosintéticos y poder reductor del agua. Para la fotosíntesis utilizan la bacterioclorofila a y las ficobilinas (ficocianina y ficoeritrina).

Al ser un grupo tan grande y variado, presentan numerosas variaciones de una especie a otra:

- Pueden tener vesículas de gas
- Heterocistes para la fijación de nitrógeno
- Intercambian material con células vecinas
- Ficobilinas negativas y CRII negativo
- Pared celular gruesa
- Cianoficina (codón de Asp+Arg)
- Movilidad por deslizamiento
- Quimiotaxis y fototaxis
- Hormogonia: Fragmentación de filamentos
- Acinetos: esporas durmientes
- Resistencia a desecación y temperaturas altas

Respecto de su fisiología, tienen una nutrición simple, pudiendo utilizar el NO₃⁻ o el NH₄⁺ como fuentes de nitrógeno. Muchas cianobacterias son fijadoras de nitrógeno y la mayoría son fotótrofas estrictas. Las hay que asimilan compuestos reducidos de carbono (CRC) y otras que respiran azúcares. Finalmente muchas de ellas producen neurotoxinas y geomina (olor a tierra húmeda).

Ecología y filogenia: Las cianobacterias son universales y toleran los ambientes extremos. Pueden vivir tanto en la superficie como en el interior de las rocas y forman grandes desarrollos (Blooms) en océanos o lagos ricos en nutrientes (contaminados) y pueden vivir en simbiosis líquénica.

El porcentaje de guaninas y citosinas es amplio, rondando el 35 al 71% en las unicelulares. Se agrupan filogenéticamente por morfología, excepto las unicelulares que son muy variables.

Las Proclorofitas: Son unos organismos similares a los cloroplastos y a las cianobacterias y filogenéticamente relacionadas con ellas. Son fotótrofos oxigenicos con clorofilas a y b, pero no poseen ficobilinas. Algunos ejemplos de Proclorofitas son los siguientes:

-*Prochloron*: Son simbioses de invertebrados marinos, de 8-10 micras de tamaño, poseen tilacoides y carotenoides (como las cianobacterias) y son Gram negativas con cubierta de ácido murámico.

-*Plochlorotrix*: Son microorganismos filamentosos, con tilacoides poco desarrollados y con proporción de Clorofila a y b de 8 a 1 respectivamente. Son difíciles de obtener en cultivo puro en laboratorio.

-*Prochlorococcus*: Se encuentran en concentraciones elevadas en los océanos (del orden de 10^5 - 10^6 c/ml). Su proporción de clorofilas a y b es de 1, aunque su Clorofila a es de un tipo modificado llamado divinil Clorofila a. También tienen β -carotenos.

Relación entre Prochlorofitas y los Cloroplastos: Las prochlorofitas tienen un espectro idóntico al de las clorofilas. Remontándonos a la teoría endosimbiótica de los cloroplastos, cabe pensar que las Prochlorofitas podrían ser el descendiente directo de los cloroplastos no endosimbióticos, aunque quedaría por determinar el origen de la clorofila b. Según la filogenia actual, el origen es común, aunque el ancestro común aun sea desconocido.

Phylum 10: Bacterias verdes del azufre (BVS):

Las bacterias verdes del azufre son bacterias fotosintéticas anoxigenicas y por lo general no tienen otro sistema de obtención de energía, aunque las hay fotoheterótrofas y fotoautótrofas (que no tienen ciclo de calvin sino CAT-1). Usan el H₂S como poder reductor, y el azufre es adquirido del exterior. Son morfológicamente diversos y se encuentran en lagos meromicticos y allí donde hay bacterias rojas del azufre, aunque estas toleran peor el H₂S que las bacterias verdes del azufre y por tanto las BVS pueden vivir en el fondo de los lagos.

Las especies modelo son *Chlorobium tepidum* y *Chlorobaculum tepidum*.

Las BVS pueden formar consorcios de asociación con otros microorganismos como quimioorganótrofos o epibiontes de las bacterias verdes del azufre:

-*Chlorochromatium aggregatum*: Se encuentra en relación 12/1 y crece en el laboratorio. Se tiñe con sondas específicas para BVS y tienen un control de posición en columnas de agua.

-*Pelochromatium roseum*: Se encuentra en relación 20/1.

Phylum 13: Bacterias verdes no del azufre (BVNS):

Tienen miembros fotótrofos y quimiótrofos y en general son termófilos. Las dos generos modelo son:

-*Thermomicrobium*: Que es quimiótrofo, aerobio estricto y con unos lípidos que son distintos (1,2 dialcoholes).

-*Chloroflexus*: Que es filamentoso, forma tapetes densos y es un híbrido entre las bacterias rojas del azufre (CdR) y las bacterias verdes del azufre (Chlorosomas). Fisiológicamente se parecen a las BRS, crecen mejor en caldos de cultivo con compuestos reducidos de carbono (CRC) (Fotoheterótrofos), respiran anaerobiamente CO₂ y c. hidroxipropionato.

Tema 13: La Quimiolitotrofia:

La quimiolitotrofia es el uso de compuestos inorgánicos como dadores de electrones (respiración) y muchos de ellos son autótrofos (transporte inverso de electrones).

Las bacterias nitrificantes utilizan fuentes de nitrógenos reducidas como el amoníaco o el ion amonio. Su filogenia es poco coherente, teniendo 4 o 5 subdivisiones de proteobacterias (β , γ , δ , ϵ) y el Phylum Nitrospira. Morfológicamente son muy variables.

La nitrificación requiere de dos microorganismos, uno que primero oxide el amonio a nitroso, que aun no se han encontrado y que es extraño dado que el nitroso es toxico, y otro segundo que oxide el nitroso a nitrito. La estructura de las membranas es compleja debido al medio en que se encuentran, y también disponen de enzimas especiales como la amonio monooxigenasa y la nitritooxidasa. La mayoría solo pueden obtener energía mediante la quimiolitotrofia aerobia. Se encuentran en suelos y aguas donde descomponen

proteínas.

En laboratorio se pueden obtener en caldos de cultivo de enriquecimiento a base de sales minerales, amoníaco o NO_2^- y HCO_3^- como fuente de carbono.

Algunos géneros representativos son:

-*Nitrobacter*: que también es quimioorganótrofo y tiene acetato o piruvato (E y C).

-*Nitrospira*: que no tiene membranas internas y comparte su hábitat con las bacterias púrpuras.

-*Anamox*: que dispone de oxidación anaerobia del ion amonio. Pertenecen al Phylum Planctomycetes y no son ni Gram positivas ni negativas (no tienen peptidoglicanos). Sus compartimentos internos están separados por membranas (anaxosomas), que no es común en procariotas, además de que tienen una estructura nuclear similar al de las eucariotas. Se piensa que por todo ello podría ser el eslabón perdido del tránsito de las procariotas a las eucariotas.

Se encuentran sobre todo descontaminando ríos y océanos (*Brocadia anamoxidans*).

Procariotas oxidadoras del hidrógeno:

Tienen gran diversidad filogenética y taxonómica:

-Phylum 1: Proteobacteria ($\hat{1}$, $\hat{2}$ y $\hat{3}$)

-Phylum 2 y Phylum 3: Gram positivas

-Phylum 15: Aquifex

-Arqueas: *Crenarchaeotas* (*Sulfolobus*) y *euryarchaeotas* (*methanococcus*)

En general son aerobios, aunque crecen mejor en condiciones de microaerobiosis, debido a que tienen enzimas con cofactores metálicos sensibles al oxígeno y al Ni, y algunos fijan nitrógeno (anaerobias). Tienen distintos tipos de deshidrogenasas y la mayoría de los microorganismos son quimiolitótrofos facultativos con versatilidad de sustrato (CRC, derivados del azufre y amoníaco).

El hidrógeno puede seguir la vía respiratoria para producir ATP, pero también puede reducir NAD^+ y $\text{NADH} + \text{H}^+$ y entrar en el ciclo de Calvin (intracelular y soluble).

Algunos microorganismos crecen con CO_2 y son carboxidotróficas y autótrofas (ciclo de Calvin). Estos microorganismos tienen una importancia homocéntrica ya que eliminan el monóxido de carbono. Tienen respiración anaerobia (NO_3^-) y pueden crecer quimioorganotroficamente. Son taxonómicamente heteróteas.

Procariotas oxidadoras de azufre:

Son filogenéticamente muy extendidas, dividiéndose en dos grandes grupos, según vivan a pH neutro o pH ácido:

-*Proteobacterias*: $\hat{1}$ y $\hat{2}$ *Thiobacillus*, $\hat{3}$ *Acidithiobacillus* y $\hat{4}$ *Thiovulum*

-*Crenarchaeotas*: *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Metallosphaera*

Tienen gran versatilidad de sustratos, pudiendo usar H_2S , MS , S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^- . Son quimiolitóautótrofas, mixótrofos (energía del azufre y carbono de los CRC) y utilizan el carboxisoma (ciclo de Calvin). Son difíciles de cultivar ya que son inhibidos por la presencia de ácidos orgánicos, aunque *A. ferrooxidans* ha sido cultivado con éxito oxidando azufre y Fe^{2+} y pirita (FeS_2), por lo que es de interés en la biominería.

-*Acidithiobacillus* (*Thiobacillus*) es de gran interés en minería. Es un Gram negativo de forma bacilar, acidófilo y de filogenia coherente en las $\hat{3}$ Proteobacterias.