

MICROBIOLOGÍA

2º CCAA – 00/01

Microbiología

IECCIÓN 1: Introducción histórica a la Microbiología

Microbiología: Es la biología de los microorganismos. Ciencia que estudia los microorganismos.

Pero... Qué estudia la microbiología??? Pues estudia muchas cosas...

- Composición, estructura y función de microorganismos y sus componentes celulares: **Morfología y Citología.**
- Crecimiento, reproducción y actividades metabólicas: **Fisiología y Bioquímica.**
- Relaciones filogenéticas y taxonomía: **Sistemática.**
- Mecanismos genéticos: **Genética.**
- Distribución, cambios en el medio ambiente y relaciones con otros seres vivos: **Ecología.**
- También estudia...: **Patogeneidad e Inmunología** (Quimioterapia, antibioterapia, Microbiología industrial y biotecnología).

Microorganismos: Aquellos seres vivos que por ser de pequeño tamaño, no pueden ser visualizados por el ojo humano, necesitando para ello el **MICROSCOPIO**. Las características de estos microorganismos son las siguientes:

- **Tamaño:** su escaso tamaño ha hecho que se descubrimiento fuera tardío, aunque no su utilización. Se descubrieron con la aparición de los microscopios (juego de lentes), por lo tanto, apareció una relación entre microorganismo y microscopio, y tenemos que a mejor instrumento, mayor conocimiento lograremos de ese microorganismo.
- Para el **estudio** de este tipo de seres vivos se necesitan unas técnicas únicas, las denominadas **técnicas microbiológicas**. Dichas técnicas se necesitan para el estudio de cultivos puros, en los cuales separamos diferentes microorganismos. Para ello, utilizamos placas petri, en cuyo interior ponemos un **medio de cultivo** (sustancia que necesita el microorganismo para desarrollarse) y, por ejemplo, 1 gramo de tierra. Entonces, de ahí van a surgir numerosas colonias diferentes que provienen de una única célula, generadas por división binaria, y que ya podemos observar perfectamente. Esto es un cultivo puro, y ya podemos separarlo de los demás microorganismos.
- Pueden ser **unicelulares o pluricelulares**, pero en **ninguno** puede observarse la diferenciación de tejidos. En algunos hongos filamentosos podemos diferenciar las hifas, pero todas las células van a ser idénticas.

Así, podemos definir **MICROORGANISMOS** como: todos aquellos seres vivos unicelulares o pluricelulares, carentes de organización tisular, que por su pequeño tamaño escapan a la percepción del ojo humano y para cuyo estudio, se requiere la metodología del cultivo puro.

Dentro de estos microorganismos habrá unos determinados **TAXONES** muy diferentes: tales como virus, hongos, bacterias, metazoos, algas...

Otras características de estos seres es la ausencia de organización tisular, aunque pueden aparecer organismos pluricelulares.

Incluimos en los microorganismos a:

- 1.- seres unicelulares procariotas, **bacterias**
- 2.- seres unicelulares eucariotas, **algas, hongos y protozoos**
- 3.- organizaciones pluricelulares eucariotas, **algas y hongos**
- 4.- acelulares, **virus**

PROCARIOTAS: carecen en su interior de membranas plasmáticas que diferencien el núcleo del resto del citoplasma.

EUCARIOTAS: con organización más compleja que los anteriores, con un mayor número de sistemas membranosos, y con un núcleo diferenciado por una membrana plasmática.

En un ppio se pensaba que todos los microorganismos procariotas eran un grupo muy homogéneo, pero en los 80 se comienza un estudio (más exhaustivo) del ARN ribosómico de las bacterias, dando como consecuencia que no era tan homogéneo como se pensaba, sino que se podía llegar a diferenciar grupos tan inmensamente diferentes como procariotas y eucariotas.

Así se diferenciaron unas bacterias algo extrañas, que vivían en condiciones extremas (bacterias que podían reinar en la Tierra en su formación) y que generan metabolitos secundarios distintos, se llamaron **ARQUEOBACTERIAS:** algunas viven a altas [] de cloruro sódico y muy altas temperaturas (100°C temperatura óptima).

Esto lleva a pensar que tanto procariotas, como arqueobacterias o eucariotas provienen de un ancestro común, es decir, que no provienen unas de otras. Por tanto, se ha llegado a llamar a las **bacterias normales=eubacterias**, a las **arqueobact.=archoea** y a las **eucariotas=eucaria**.

Dentro de las eucariotas encontramos:

- hongos filamentosos: generalmente pluricelulares, aunque también hay unicelulares como las levaduras.
- algas
- algunos protozoos

Tipos:

1. Células procariotas: Las bacterias se dividen en: bacterias, eubacterias y arqueobacterias. (**eubacterias**=bacterias verdaderas, **arqueobacterias**=antiguas, pero en verdad son diferentes).

Ambas carecen de núcleo y su material genético está formado por una molécula circular de DNA que constituye un único cromosoma. Además, sus ribosomas tienen un tamaño de 70S.

Las bacterias fueron los 1ºs organismos en poblar la tierra, los 1ºs fósiles se remontan a 3.400 millones de años. Las cianobacterias fueron las causantes de uno de los cambios producidos en la tierra, aumentaron la [] de oxígeno en la atmósfera de 1% al 20%. Las bacterias son los seres vivos más resistentes, resisten altas y bajas temperaturas (pelo al agua hirviendo), también soportan la sequedad total y aparecen siempre las 1ªs en los nuevos hábitats. (por ejemplo: las bacterias son las primeras que aparecen tras un incendio).

En el interior de la célula no hay membranas que separen el núcleo, material genético mezclado, tampoco hay orgánulos.

Otra característica es que envolviendo a la membrana plasmática aparece la pared celular, salvo excepciones. Esta pared celular se encarga de dar forma y proteger de los cambios osmóticos a la célula. (una excepción son los micoplasmas, que son eubacterias procariotas pero sin pared celular). La composición de la pared en eubacterias es básicamente peptidoglicano, mientras que las archeas no tienen este componente en su pared.

Las arqueobacterias con iguales características, presentan unas diferencias en una de las subunidades ribosomales: 16S, aparecen diferencias en las secuencias comparables a diferencias con las células eucariotas.

Apar. 3 líneas de evol. difntes: **1 Bacterias 2 Arqueobact. 3 Células Eucariotas.**

2. Célula eucariota: Algas, Protozoos y Hongos

Los **Protozoos** destacan por la abundancia de estructuras membranosas, aparecen mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, el núcleo está aislado, etc...

La información genética está en varios cromosomas, ADN bacteriano en cadenas circulares. Ribosomas de 80S de tamaño. Los protozoos son organismos eucariontes heterótrofos, no presentan pared rígida sino citoesqueleto, por lo que se los incluye en el reino animal y estudiándolos por tanto la ZOOLOGÍA. También hay un determinado grupo que causa enfermedades, estudiándolos la parasitología.

Las **Algas** son organismos eucariotas autótrofos, presentan clorofila: por lo tanto realizan la fotosíntesis oxigénica. Son estudiadas por la BOTÁNICA.

Los **Hongos**, dos tipos:

- levaduras, org. unicelulares que se dividen por gemación y tienen forma redondeada. Estudiados por la MICROBIOLOGÍA.
- hongos filamentosos, org. pluricelulares: aparecen hifas (setas). Son estudiados por los micólogos, que son BOTÁNICOS.

3. Virus: seres acelulares, no considerados como seres vivos, ya que necesitan de una célula huésped (son parásitos obligados) para poder replicarse, usando los orgánulos y las rutas metabólicas. Los virus se transmiten mediante **viriones** de una célula a otra. Un virión es una parte del virus que sobrevive en un ambiente hostil.

Los virus son partículas infectivas formadas por:

- **Cápsida:** estructura externa de naturaleza proteica.
- **Mat. genético:** en el interior de la cápsida. Puede ser RNA o DNA, de cadena doble o cadena sencilla.

Cada tipo de virus se introduce en un tipo de célula determinada y la bloquea, se apropia de su metabolismo y

usa los métodos de replicación de la misma. Para poder replicarse a sí mismo, la información genética de la célula le dice que forme proteínas de la cápsida y ADN vírico. Entonces, cuando se han formado muchos viriones, la célula sufre lisis/ruptura y los viriones salen al exterior.

Los virus se incluyen en los microorganismos, no porque sean organismos vivos, sino porque son mucho más pequeños, necesitan cultivos puros para estudiarse y no tienen organización celular. (ni siquiera tienen células).

4. Partículas subvíricas: Se ha descubierto que son causantes de nuevas enfermedades, hay dos tipos: **virioides**=pequeñas moléculas de RNA circular monocatenario, pero carentes de estructura proteica, el RNA tiene la información necesaria para sintetizar dos proteínas pequeñas que provocarán enfermedades sobre todo en plantas. **Priones**=agentes infecciosos formados por proteínas, causantes de la enfermedad de las vacas locas por ejemplo. La proteína activa un gen que está en la célula huésped (que estaba inactivo hasta ese momento) y que replica la proteína.

Descubrimiento (en orden cronológico) del mundo de los

MICROBIOS

La microbiología es una ciencia muy nueva, aunque los organismos que estudia hayan sido los primeros en poblar la tierra. Hasta el siglo XVII no se empezó a suponer la existencia de microorganismos.

1676 Leeuwenhoeck. Comerciante holandés que se dedicó a pulir lentes y a observar todos los tejidos que iba construyendo. Estudió granos de polen, fluidos corporales, sarro de los dientes, y vio unas pequeñas estructuras que podían moverse y las llamó **animáculos**.

La Royal Society entró en el asunto. Entonces surgió la pregunta siguiente, de donde provienen estos animáculos???

Por un lado están los Por otro lado están los partidarios

partidarios de la generación de que parten de otros

espontánea animáculos o de otro organismo

diferente (pues vaya...)

1688 Francisco Redi. Acaba con la idea de la generación espontánea (**Experimento de Redi**). Utiliza unos botes de cristal con trozos de carne, dichos botes los tapa con unas gasas que permiten el paso del aire pero de nada más, entonces no se generan "animáculos" en estos trozos de carne. La solución está en las larvas que son depositadas por moscas que se posaban en la carne, en los botes sin tapar, y hacían posible la aparición de esos "animáculos".

1765–1775 Spallanzani. El calentamiento puede evitar la aparición de los animáculos, pero cuando aparecían era por el aire que entraba, por lo que se dedujo que estaban en el aire.

ppos siglo XIX Appert. Inventor de la industria conservera (Método de la apertización), que consiste en el sistema que tienen las latas de conservas que actualmente consumimos.

Al mismo tiempo **Lavoisier** estudia la química de los gases y hace un estudio en profundidad del oxígeno (vital para todo), trata de echar por tierra la teoría de Spallanzani, tanto Appert como Spallanzani dicen que el problema es que no hay oxígeno y por eso no se desarrollan los animáculos.

1861 Luis Pasteur. Demuestra que hay animáculos en el aire, pasando un tubo con aire y un algodón en el medio impregnado de eter. Lo miraba al microscopio y veía organismos, pero en cambio cuando lo hacía con aire caliente no veía absolutamente nada.

Pasteur además desarrolló unos matraces con el cuello muy largo, para que pudiera entrar el oxígeno, pero por la sinuosidad del cuello los microorganismos no podían entrar.

Tindal. Trabaja con una serie de infusiones de caldo caliente y veía que no se desarrollaban microorganismos. Con 5 o 10 minutos en las de carne tampoco se desarrollaban organismos. Luego probó con heno y si que aparecían microorganismos. Tindal pensó que debía haber microorganismos que formaran estructuras de resistencia. **Tindalización:** Método por el cual se realizan calentamientos cortos pero dejando un espacio largo de tiempo entre medias.

calentar 10 m -----> calentar 10 m

espacio largo

de tiempo

Tindal y Cohen descubren las esporas.

Cohen. Generación de estructuras de resistencia llamadas **esporas** (aguantaban los 100° de Tindal).

esporas aguantan mata los microorg. se desarrollan todos

pero las esporas los microorg. y una vez

resisten desarroll. mueren al

CALOR ser calentados

CALOR

CALOR

TINDALIZACIÓN: 30 m en 3 días, con 24 horas de separación. Se calienta 30 minutos cada uno. A partir de todos estos trabajos, comenzó el desarrollo de la microbiología, que se encaminó a demostrar que muchos de los fenómenos que no se sabía por que ocurrían, podían ser debidos a la presencia de microorganismos (procesos tales como: enfermedades, fermentación...)

Lille. Utilizan los métodos de Pasteur para su fabricación de alcohol partiendo de remolacha.

Pasteur descubrió que había diferentes microorganismos cuando el proceso de la fab. del alcohol salía bien y otros cuando salía mal. Pasteur se pasó mucho tiempo estudiando el fenómeno de las fermentaciones. Estudió la fermentación butírica, y se dio cuenta que en ausencia de oxígeno también podían aparecer microorganismos. Pasteur es el primero que introduce los términos de **aerobio y anaerobio**. (aerobio=los microorg. aparecen con oxígeno, anaerobio=org. que pueden aparecer sin oxígeno).

Pasteur llegó a la conclusión que estos microorganismos que veía y estudiaba, podían estar implicados en las "enfermedades" de las fermentaciones.

1850 Rayer. Observó que en la sangre de animales enfermos, había organismos que podían ser causantes de

la enfermedad. Carbunco y Antrax son enfermedades con las que estudió Rayer.

Los organismos afectados tenían un determinado microorganismos en la sangre.

1876 Koch. Médico rural alemán que observó la presencia de microorganismos en la sangre de animales. Fue el primero que desarrolló o que **aisló** un microorganismo en cultivo puro. **Postulados de Koch:** Un microorganismo es el responsable de una enfermedad o de otro proceso cualquiera.

Postulado 1: El microorganismo debe estar presente en animales afectados y ausente en los sanos.

Postulado 2: El microorganismo debe ser aislado en un medio de cultivo puro.

Postulados 3 y 4: Este microorganismo que hemos obtenido, inoculado en un animal sano, nos proporciona otros microorg. parecidos a los 1ºs obtenidos y el animal debe enfermar también. Koch realizó cultivos con patatas!!!

forman colonias y son cultivos

puros de microorganismos

Koch pensó que el cultivo se podía hacer en un medio líquido y transparente que tuviera la posibilidad de solidificar, utilizó entonces **gelatina** (pero no era buena porque se licua por encima de los 28°C y se la comen los microorganismos, al igual que la patata).

1883 Hesse. Utilizó **agar-agar** que es lo que se utiliza en la actualidad. Presenta dos ventajas muy importantes:

100°C ----- 45°C (con temperaturas inferiores a 45°C está sólido)

1. no es utilizado por ningún microorganismo

2. bastante resistente a la licuefacción

Petri. Inventor de la famosa placa Petri. Estos dos descubrimientos, el de Hesse y el de Petri, potenciaron la microbiología de una forma extraordinaria.

Por esta época se aíslan la mayoría de los responsables de las enfermedades contagiosas que estaban causando estragos en esos años, tales como la difteria, paludismo, cólera...

A finales del siglo XIX se conocían los causantes de la mayoría de las enfermedades infecciosas. Como ya se conocían, los estudios se centraron en el control de éstas y se empieza a hablar de **asepsia**, **quimioterapia** y **antibioterapia**.

Hacia el 1840 se comienza a usar la anestesia en intervenciones quirúrgicas, y con la introducción de estas se mejoran las técnicas quirúrgicas, pero aumentan las enfermedades y las muertes post-operatorias.

1847 Sommerfield. Médico austríaco que recomienda la limpieza de las manos con agua de cal, pero no tiene nada de éxito. (asepsia)

20 años después, en **1867** se recomienda la esterilización de materiales y la utilización de desinfectantes post-operatorios. (Lister)

También se comienzan a buscar sustancias letales para los microorganismos pero que no lo sean para el hombre. (quimioterapia)

Erlhichs. Utiliza un compuesto llamado **Salvarsan** (compuesto a base de sales arsenicales) para el tratamiento de la sífilis. Al mismo tiempo, Tindal y Pasteur llegan a una conclusión muy importante, piensan que el tratamiento de enfermedades se podía solucionar con bacterias.

FLEMING. Estaba aislando estafilococos, y se le contaminaron con un hongo, pero se dio cuenta que donde estaba ese hongo se inhibía el crecimiento de la bacteria, por lo tanto siguió estudiando este fenómeno.

Florey y Chang. Penicillium notatum Aíslan la penicilina. Fue el primer antibiótico que se desarrolló. La terramicina (1950) y la estreptomycinina siguieron a la penicilina.

A partir de estos momentos nacen conceptos tales como:

ANTIBIÓTICO: Sustancias producidas por microorganismos, que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Géneros como Aspergillus (hongos filamentosos, Penicillium) y Streptomyces (la mayoría, casi el 90%).

**** Es muy importante hacer la siguiente apreciación: HAY MICROORGANISMOS RESISTENTES A CADA ANTIBIÓTICO!!!**

INMUNOLOGÍA: Personas que habían padecido enfermedades infecciosas presentaban una resistencia a volver a contraer dicha enfermedad. Ya en la Edad Media, se inmunizaba contra la viruela a individuos sanos con pústulas de viruela.

Jenner. Comienza a vacunar contra la viruela con pústulas de vaca.

Pasteur. Estudiaba la cólera aviar con gallinas. Pasteur utilizó un cultivo puro que había tenido un tiempo en el laboratorio. Entonces, las gallinas no morían y tampoco con microorganismos nuevos, por lo tanto pensó que se habían atenuado los microorganismos y que las gallinas habían desarrollado una especie de resistencia. Desde este momento, se conoce que la inoculación con microorganismos debilitados da lugar a un alto grado de resistencia "específica o **inmunidad**". **Ppo básico de inmunidad**

1884 Pasteur. Inventa la vacuna contra la rabia.

Jaime Ferranz (Español, valenciano) inventa la vacuna contra la cólera.

A partir de este momento pasamos a un estudio fisiológico en los ambientes naturales de los microorganismos.

En **1882 Winogradski** descubre la enfermedad del mosaico de la hoja de tabaco. Tanto Winogradski como **Beijeriuk** estudian los microorganismos en su hábitat natural, es decir, sin aislarlos y descubren que dichos microorganismos tienen una gran diversidad metabólica, pudieron observar que había bacterias quimioautótrofas que aparecían en medios totalmente inorgánicos. También vieron que hay microorganismos fijadores de nitrógeno, que hacen posible que se cierre el ciclo de éste y nuestra posterior respiración. Vieron que había microorganismos en raíces de plantas leguminosas, en estas raíces se forman unos nódulos donde hay bacterias que fijan el nitrógeno y hacen que aumenten y mejoren las cosechas.

El descubrimiento de los últimos microorganismos estaba muy relacionado con las enfermedades, ya que, en muchas de ellas no se había podido aislar el microorganismo causante de la misma (gripe...) **Tvanosky**, estudiaba la enfermedad del mosaico del tabaco, y vio que aún usando filtros para retener bacterias, seguían

contaminando las plantas: lo llamó **virus filtrable**. Fue Beijerinck quien demostró en 1898 que esta enfermedad estaba causada por un virus, que necesitaba otras células para poder multiplicarse.

En 1935, **Stanley** aísla el primero de estos virus y comprueba que no es una célula, que sólo se compone de proteínas y de ARN. Emplea para su cultivo células de embriones de pollo.

Con esto llegamos a la actualidad, pasando por los hechos más relevantes de la historia de la microbiología. A partir de la microbiología se ha contribuido al desarrollo de otras ciencias, tales como la genética, por ejemplo: *Escherichia coli*; bioquímica, biología celular, ecología microbiana; cada día se descubre que los microorganismos están presentes en más procesos.

IECCIÓN 2: Observación de los Microorganismos

La observación de los microorganismos no fue posible hasta la invención de los **microscopios**, por Leeuwenhoek. El primero en inventarse fue el microscopio simple, aunque actualmente los que se usan son compuestos.

Microscopio simple: formado por una lente óptica biconvexa.

Microscopio compuesto: en la actualidad, formado por varios sistemas de lentes.

Tipos de microscopios

MICROSCOPIO ÓPTICO MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

- Luz ordinaria – **Transmisión:** los electrones inciden directamente sobre la muestra
- Luz ultravioleta – **Barrido:** Los electrones no atraviesan la muestra, sino que inciden lateralmente

Con el microscopio de barrido únicamente vemos la superficie. En cambio, con el de transmisión podemos ver cortes estructurales.

Microscopio Óptico: el microscopio consta de un tubo en cuyos extremos se sitúan dos lentes:

- 1) **Ocular**, lente próxima al ojo
- 2) **Objetivo**, lente cercana al objeto de estudio

Platina: plataforma donde se coloca el portaobjetos con la muestra. La fuente luminosa es la luz natural, normalmente bombilla, antiguamente se usaban espejos. También hay lentes que condensan la luz. Todo el soporte se denomina **estatipo**. Hay dos tipos de tuercas que van a permitirnos un perfecto enfoque: **macro y micro**.

El número de aumentos total es el producto de los aumentos del ocular y objetivo. Los objetivos, normalmente 4, se colocan en el **revólver**, con aumentos de 3, 10, 30 y 100. El aumento del ocular suele ser x10 o x15.

Todas las lentes tienen algún defecto, son las conocidas **aberraciones**. Tipos de aberraciones:

- **Esférica:** no es posible enfocar homogéneamente por toda la superficie.
- **Cromática:** aparecen iridiscencias en el contorno de los objetos observados.

1) Microscopio óptico de luz ordinaria. Características y funcionalidad

La calidad de la imagen observada depende de varios parámetros, pero sobre todo del **poder de resolución**=capacidad del microscopio de ver la distancia entre dos puntos del objetivo. A mayor calidad del microscopio mayor poder de resolución.

El poder de resolución depende de λ
de la luz incidente y de otro factor, la **apertura numérica**.

$$PR = \frac{\lambda_{\text{luz incidente}}}{2 A.N.}$$

A su vez, la apertura numérica (A.N.) depende de n, que es el **índice de refracción del medio**. Para el caso del aire=1 y θ
es el **ángulo de observación** con el microscopio, que estandarizado corresponde a 58°. Por lo tanto, tenemos que **A.N.=n.sen θ**
=1.sen 58°=0,8.

La λ
de la luz solar varía entre 350–700 nm. Cogiendo un valor medio tal como 500 nm, el resultado es el siguiente:

$$PR = \frac{500}{2.0,8} = 312 \text{ nm} \cong 300 \text{ nm}$$

Veremos, entonces, puntos que estén como mínimo a esta distancia.

Para disminuir el poder de resolución, ver mejor, utilizamos el microscopio de luz ultravioleta. Con el microscopio óptico también podemos variar el poder de resolución, se hace aumentando el denominador. Basta con utilizar un medio con índice de refracción mayor que el aire, por ejemplo el **aceite de cedro**, que tiene n=1,2.

Otra forma de mejorar el poder de resolución es bajar la λ
, luz ultravioleta (100–350nm).

$$PR = \frac{250}{2.0,8} = 200 \text{ nm}$$

Existen varios tipos en función de la orientación de la luz que utilizamos, y dependiendo también del tipo de microorganismo que queramos observar:

- **M. O. de campo claro:** el más utilizado, observamos en él un fondo luminoso, color claro pero en el organismo tenemos un ligero color oscuro (vemos las sombras). Si la luz no encuentra "nada" en su camino, se divisa el campo claro.
- **M. O. de campo oscuro:** al contrario, el fondo es de color oscuro pero lo que observamos, es decir, el microorganismo está claro. Se consigue colocando en el condensador una anilla que permite el paso de unos rayos de luz que serán enviados, reflejados, de tal manera que si no encuentran nada no entran en el objetivo, no se ve nada-----> **campo oscuro**. Por el contrario, los rayos que encuentran algo son reflejados produciendo una señal luminosa.

– **M. O. de contraste de fases:** Las estructuras internas de las células presentan diferentes índices de refracción, y también diferente al medio que les rodea, con lo cual es con estas diferencias con las que funciona el microscopio de contraste de fases. Se emplean objetivos de fase y condensadores especiales, que hacen lo contrario que los normales.

La λ

de la luz ordinaria al pasar por este condensador se desfasa si no encuentra nada en su camino, campo claro. Pero si estas ondas desfasadas se encuentran con algo, se desfasan aún más en función del índice de refracción. Este fenómeno no es un campo oscuro, es gris pero con diferentes tonalidades en función de la estructura.

Para el caso de las bacterias, al haber pocos orgánulos este microscopio resulta muy poco útil. En cambio, con las levaduras o los hongos filamentosos se produce una mejoría notable en la observación.

La utilización más común para cada uno de estos tipos es la siguiente:

– **CAMPO CLARO:** su ampliación máxima útil son 1000–2000. La muestra, aparece teñida o no del color del colorante utilizado. Se usa generalmente para ver características morfológicas de bacterias, hongos, algas y protozoos.

– **CAMPO OSCURO:** su ampliación máxima útil son 1000–2000. La muestra aparece brillante, sobre un fondo oscuro (generalmente no se tiñe). Se usa para ver microorganismos que muestran alguna característica morfológica en estado vivo y en suspensión. (flagelos o cápsida por ejemplo).

– **FLUORESCENCIA:** su ampliación máxima útil son 1000–2000. En la muestra se ven bacterias brillantes y coloreadas, con el color del compuesto fluorescente. Estos compuestos transforman la luz, aumentan la longitud de onda para que podamos ver la luz ultravioleta, que es la que los activa.

El más utilizado es el microscopio de campo claro, pero con objetivos que produzcan el contraste de fases, pudiendo alternar esta posibilidad con gran facilidad.

2) Microscopio óptico de luz ultravioleta. Características y funcionalidad

Inconveniente: la luz ultravioleta no es visible por el ojo humano. Para poder verla se hace incidir sobre una pantalla o si no por excitación fotográfica. Pero sobre todo se utilizan sustancias químicas que absorben la energía de la luz ultravioleta y emiten radiaciones que pueden ser vistas, **colorantes fluorescentes**. Existen células que de por sí son fluorescentes.

TÉCNICAS PARA LA OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ÓPTICO:

– **M. O. de campo claro: a)** Para el microscopio de campo claro, la forma más sencilla para observar los microorganismos, es lo que se denomina preparación en fresco. Consiste en que tenemos microorganismos vivos en un cultivo, para ello utilizamos el **asa de siembra**, formada por un mango y una aleación de un metal para que se pueda calentar fácilmente, esterilizándolo por tanto con fuego. Luego, con dicho instrumento, cogemos una muestra (pequeña película) y la colocamos sobre el portaobjetos (si el medio no es líquido, ponemos una gota de agua, y en ella distribuimos un poco de muestra), colocando encima el cubreobjetos. Finalmente lo observamos. Sirve para ver la morfología y poder saber si son móviles o no.

Puede ocurrir que el peso del cubre aplaste al microorganismo: utilizamos entonces la **técnica de la gota pendiente**, para ello utilizamos un porta con una pequeña excavación en el centro, y a continuación colocamos una gota sobre el cubre, le damos la vuelta y la colocamos encima del porta, quedando la gota pendiendo en el aire.

Pero si queremos obtener más información, debemos emplear otros tipos de técnicas:

b) tinciones, alteramos el estado de la célula, la matamos e intentaremos mantenerla con características parecidas a su estado natural. El proceso cuenta con varios pasos:

1.- frotis o extensión, consiste en extender por toda la superficie del porta la muestra de los microorganismos que queremos ver.

2.- proceso de fijación, se utilizan diferentes compuestos, aunque la más utilizada es la **fijación con calor suave**, que mata al organismo pero mantiene las estructuras que se quedan pegadas al porta. La fijación propiamente dicha consiste en que colocamos agua en el porta (si es sólido) y con el asa de siembra cogemos una muestra y la extendemos sobre esa gota de agua (o sobre la muestra si es líquida). Más tarde, calentamos suavemente con un mechero, hasta que el agua se seque.

3.- tinción, aplicamos sustancias que se fijan a diferentes estructuras, tienen color, pudiendo ver así las estructuras teñidas. Tipos de colorante:

- cromogéneos: coloreados de por sí.
- auxocromos: sin color, pero al entrar en contacto reaccionan y se colorean.
- ácidos: reaccionan con estructuras básicas de la célula (la mayoría en la célula bacteriana).
- básicos: reaccionan con estructuras ácidas. En las células cuyo ácido nucleico está distribuido por todo el citoplasma, se usan colorantes básicos como el azul de metileno.

En función de los colorantes habrá 2 tipos de tinciones:

A) Simple. Es la más sencilla y sólo utilizamos un tipo de colorante. La más corriente es la que se utiliza con azul de metileno, que consiste en hacer el frotis y la fijación y cubrir todo el porta con una disolución de colorante, después se deja actuar el colorante durante 5 minutos, se retira el exceso de éste con agua y se deja secar al aire. Observamos por el microscopio y vemos todos los organismos de color azul.

B) Diferencial. Vemos diferencias entre organismos. Utilizaremos dos tipos diferentes de colorantes, siendo el método más utilizado la tinción de Gram.

- **Tinción de Gram:** nos da como resultado dos tipos de organismos, gram⁺ y gram⁻; en función de la estructura de la pared celular, da la forma a la bacteria que es rígida. La estructura es diferente pero no la composición. Los organismos con Gram⁺ tienen un 90% de peptidoglicano, mientras que los Gram⁻ cuentan únicamente con un 20%.

Método para realizar la tinción de Gram: Paso 1) realizamos el frotis y se fija al calor. Paso 2) teñimos primero con **crystal violeta durante dos minutos**, es una tinción simple. Paso 3) luego se aplica **lugol** (lugol=mezcla entre I₂ y yoduro potásico) **durante otro minuto**, es un mordiente que facilita la penetrabilidad del anterior colorante, altera la estabilidad del peptidoglicano de la pared celular de bacterias. Paso 4) Por último, se decolora con alcohol de 96° o cetona. El alcohol disuelve el colorante, extrae el crystal violeta en capas delgadas de peptidoglicano, osea Gram⁻. En cambio, el alcohol no lo extrae en las capas gruesas, osea Gram⁺. Las + están decoloradas. Paso 5) para acabar, utilizamos un colorante de contraste, con color diferente, como la **safranina** (color rojo) y así podemos ver perfectamente las -. En la práctica no es tan fácil la diferenciación, por ejemplo en el caso de las esporas.

Gram entonces descubrió 2 tipos de bacterias: unas más moradas, que las llamó GRAM⁺ y otras más rojas,

que las llamó GRAM-. Después se comprobó que este comportamiento se debía, en gran parte, a la diferente cantidad de peptidoglicano en unas y otras. (las GRAM+ tienen una capa mayor de peptidoglicano que las GRAM-)

– **Tinción ácido alcohol resistente (AAB) o Ziel-Neelson:** tinción diferencial que nos va a separar a dos grupos diferentes. Como 1er colorante se utiliza **Fuchina fenicada** (potenciada por fenol) que proporciona una coloración rosa fuerte, lo aplicamos durante cinco minutos y además, calentamos brevemente. A continuación, decoloramos con alcohol ácido (no de 96°), los organismos ácido alcohol resistentes no se decoloran y viceversa. Por último, utilizamos un colorante de contraste, como el azul de metileno; quedándonos los siguiente grupos: **AAR+: Rosa fuerte (resisten la decoloración)**, **AAR-: Azul.** (AAR+: Mycobacterias, Mycobactirium tuberculosis (causantes de la lepra, tuberculosis...)).

– **Tinción de esporas:** estructuras de resistencia que se forman en el interior del organismo, forman numerosas capas de resistencia. Las esporas, por tanto, no se tiñen con colorante normales, aunque existe uno específico que es el **verde malaquita**. Lo aplicamos durante 5 minutos y a la vez calentamos suavemente. A continuación, quitamos el exceso (no haciendo falta la decoloración, ya que es específico) y como contraste aplicamos la **safranina** durante un minutillo. **Si el organismo desarrolla esporas estará verde, y si no tiene esporas aparecerá rojo** (safranina).

C) Negativa. Esta tinción es una alternativa al microscopio de campo oscuro, ya que, la imagen obtenida es parecida a la que obtenemos con este. No **teñimos** el microorganismo, sino **el medio donde se encuentra**. Colocamos una gota de colorante, **nigrosina** en este caso. El frotis sobre el porta lo hacemos con este mismo colorante, que no penetra en el organismo, quedando un fondo oscuro y la bacteria clara. Se utiliza para poner de manifiesto la cápsula. (externa a la pared celular)

– **M. O. de luz ultravioleta:** Se usan colorantes obligatoriamente, debido a que la luz UV no se ve. Se utiliza para ver diferentes tipos de bacterias y en reacciones antígeno-anticuerpo (Antígeno=sustancia capaz de crear anticuerpos). Hay especies que sólo se diferencian en el antígeno. Marcamos anticuerpos con diferentes colorantes, luego los inoculamos y al asociarse con el antígeno, sabremos de su presencia. Es caro, por lo que se utiliza un método indirecto: se utilizan anticuerpos que tienen partes comunes (asexuales), luego también se usa un antígeno que es antídoto. Se utiliza en un único anticuerpo el colorante, sólo se tiñe uno. Sólo es fluorescente cuando se une al antígeno con el anticuerpo.

Microscopio Electrónico: la luz se sustituye por un haz de electrones que pasan por un tubo (para mejorar el paso de los electrones, en el tubo se ha hecho el vacío). **Importante:** Permite la observación de las estructuras interiores de las células. Sirve para visualizar virus. Tiene una resolución de 10Å (se pueden ver cosas muy pequeñas, incluso moléculas).

Fuente luminosa: Haz de electrones lanzado por un cañón en el que se establece una diferencia de potencial, entre el cátodo y el ánodo. 2 tipos:

TEM Transmisión

El chorro de electrones pasa a través de la muestra a observar, que está colocada en una rejilla ($d \ll 3 \text{ mm}$).

Scanning De barrido

Los electrones chocan con la muestra y se desvían, y estas desviaciones son recogidas por la pantalla.

La imagen que vemos, la observamos a través de una pantalla que es excitada por los electrones que llegan a ella (mecanismo parecido a la televisión).

Las imágenes las recogemos mediante una placa fotográfica que es impresionada directamente por los electrones.

El haz tiene una longitud de onda muy pequeña, por esto la resolución es tan pequeña: **pequeño poder de resolución**. Problema: los electrones tienen poco poder de penetración en el medio normal, por lo que para permitir/facilitar el desplazamiento, hay que realizar el vacío en el medio tubo a través del que se desplazan.

Existen condensadores/electroimanes que dirigen la dirección del haz. Es un tubo acoplado a todo un sistema para realizar el vacío. Luego hay una pantalla de TV. Cámara fotográfica.

Hay diferentes técnicas para los diferentes tipos de microscopio electrónico:

– **M.E. transmisión**, sirve para observar estructuras internas de la célula.

Método de corte fino: consiste en cortar las bacterias y observar las estructuras internas de ellas. Para la realización de estos cortes, el material a estudiar hay que laminarlo en rodajas muy finas (cortes) y colocarlas sobre una rejilla metálica (equivalente al portaobjetos en el microscopio óptico). Para realizar estos cortes, antes tenemos que realizar una serie de manipulaciones en la muestra:

– **FIJACIÓN:** mantener la célula muerta pero con las características intactas. Lo más parecido posible a lo natural. Se usan compuestos químicos, como **gluteraldehído**, **permanganato potásico** y **tetróxido de osmio**.

– **INCLUSIÓN:** en una sustancia dura que nos permita luego cortar. Se usan resinas con dos componentes: EPOXI, que hay que mezclar y esperar a que polimerice.

Pero para incluir, debemos realizar otro paso:

DESHIDRATACIÓN: sacar todo el agua, para poder ser sustituido por resinas, que son solubles en alcohol/acetona. Sumergimos la célula en disoluciones de alcohol, cada vez $> [\text{alcohol}] < [\text{agua}]$. 60% 70% 80% ... hasta 100% resina.

Ahora se espera 1/2 hora o 1 hora, de reposo.

Una vez que la tenemos llena de alcohol, la llenaremos de resinas que sí que son solubles en agua. La operación es la misma, se hace gradualmente, con disoluciones de resinas cada vez $> [\text{resina}]$, para que esta resina polimerice. Tratamiento térmico (24h – 60°C).

Se obtiene así un cilindro (de resina polimerizada) en cuyo interior está la muestra. Cortamos con un **ultramicrotomo** en láminas muy finas y ya podemos observar las estructuras de la célula sin problemas. (dicho microtomo realiza cortes únicamente visibles a la lupa). La muestra se hace pasar por la cuchilla (de vidrio o diamante) realizándose cortes muy pequeños, y se colocan sobre la rejilla metálica=portaobjetos. Esta rejilla se pone en el centro del tubo del microscopio, de modo que los electrones atraviesan la muestra, en función de la opacidad obtenemos una imagen con tonalidades grises.

Un inconveniente de este procedimiento es que la muestra no es muy duradera, ya que, con el paso de los electrones se va deteriorando poco a poco.

Para favorecer y remarcar estas diferencias de coloración, se pueden usar: **TINCIONES**, con metales pesados (acetato de plomo). Se fijan a diferentes estructuras celulares, y estos metales pesados no permiten el paso de los electrones, por lo tanto, tenemos un mayor contraste.

Sombreado (TEM): Se realiza una fijación igual a la que realizábamos para los cortes finos. Con esta

técnica, vemos la superficie o la célula entera, pero no las estructuras internas.

Se cubre todo el organismo con una capa metálica, sobre la que incide de manera lateral el haz de electrones. Son como imágenes en negativo, y generalmente se suele utilizar oro.

Tinción negativa: Se usa el **ácido fosfotúngstico**, que ensombrece el fondo de la preparación (imagen similar a la anterior). Da una imagen, la forma externa, de lo que observamos en claro (fondo oscuro).

Crioactura: Permite observar las estructuras internas. No se deshidrata, pueden aparecer "artefactos" como asas agregadas a la célula, debidas a todo el proceso.

No se incluye en la resina: se endurece la célula congelándola. Se congela en Nitrógeno líquido (bajas temperaturas) el agua que forma la célula en estado sólido. Al cortar se suele romper por alguna de las estructuras celulares, una fractura. La superficie se recubre de material metálico, que permite visualizar la forma.

– **M.E. de Barrido**, los electrones no atraviesan la muestra, sino que son reflejados y recogidos por un amplificador: transmitidos a la televisión y la cámara de fotos. Tiene un mayor poder de resolución que el anterior, vemos cosas más grandes.

Vemos la estructura externa de las células a observar: no hay cortes, pero si necesitamos hacer fijaciones (en cambio, no es necesario deshidratar). El proceso que realizamos es la **metalización**, depositamos sobre la superficie la capa metálica que refleja los electrones, entonces la imagen es la de la superficie de las células. La imagen que obtenemos es similar a la del sombreado, pero en este caso suelen darnos imágenes 3D.

IECCIÓN 3: Estructura y función de la célula de los Microorganismos Procariotas

Hasta 1950, fecha en que se desarrolla el microscopio óptico, no pudo haber un desarrollo de la microbiología, pero con la aparición de éste se abrieron una cantidad de posibilidades enormes, ya que entre otras cosas, nos permite estudiar las estructuras internas de los microorganismos. Diferenciamos entonces:

– **CÉLULA EUCARIOTA:** estructuras más complejas, de mayor tamaño. Eucariotas son las células animales, vegetales, hongos, metazoos, algas.

– **CÉLULA PROCARIOTA:** estructuras mucho más sencillas. De este tipo son todas las bacterias.

Diferencia entre ellas, además de la complejidad:

CÉLULA PROCARIOTA	CÉLULA EUCARIOTA
carecen de membrana nuclear, por lo que el material genético no está separado del resto de citoplasma por estruc. membranosas	el material nuclear aparece separado del resto de material citoplasmático (tienen membrana nuclear)
tiene una molécula de ADN circular. No se divide por mitosis	ADN agrupado en varias moléculas de cadena lineal, y se dividen por medio de un proceso organizado ---> MITOSIS
ribosomas + pequeños	ribosomas de mayor tamaño
Procariotas: 70s	Eucariotas: 80s
no hay sistemas membranosos internos	aparecen sist. membranosos internos
no aparecen esteroides en la membrana plasmática, salvo una excepción: MICOPLASMAS	membrana plasmática formada por esteroides

CÉLULA PROCARIOTA: Composición

Su componente fundamental es el agua, que puede alcanzar el 90% (células jóvenes) o el 70% (para el caso de células viejas), además tenemos proteínas, lípidos y carbohidratos. La composición cuantitativa de la célula, varía a lo largo del ciclo de vida de la misma.

Tienen una barrera que las aísla del medio externo, es la denominada **membrana celular, plasmática o citoplásmica**. Esta membrana separa, delimita la célula y es por donde van a pasar los diferentes nutrientes que necesita la célula.

Si únicamente existiera esta membrana, las bacterias dependerían de la presión osmótica del medio en que vivieran, ya que, es bastante débil. Entraría entonces el agua en la célula por ser mayor la [solutos] dentro de la célula, y estallaría. Para evitar esto, se ha desarrollado otra estructura externa a esta membrana plasmática: **la pared celular**, presente en todas las células procariotas (excepto en los micoplasmas).

También hay pared celular en células eucariotas (células vegetales), aunque su composición es diferente, también los hongos y algas. Por el contrario, carecen de pared celular los metazoos y las células animales, que tienen otros mecanismos frente a la osmosis. La pared celular da forma y estabilidad a la bacteria. Si se elimina (mediante tratamientos químicos), se obtiene un protoplasto, que debe mantenerse en un medio isotónico para que no estalle.

Externamente a la pared celular, puede haber una estructura llamada **cápsula o glicocálix**, que tiene diferentes composiciones en las diferentes bacterias que la tienen. Suele estar relacionada con la patogeneidad de la bacteria. No es una estructura esencial.

También hacia el exterior, puede presentar estructuras filamentosas, que pueden ser:

- LARGAS, **flagelos**. Otorgan movilidad a las bacterias.
- CORTAS, **pelos, pili o fimbrias**. Aparecen en mayor número que los flagelos. No intervienen en la movilidad, sino que están relacionados con la recombinación genética.

En el interior de la célula no existen sistemas membranosos, sólo se observan invaginaciones de la membrana plasmática (sobre todo en la zona central).

MESOSOMAS, desaparecen al quitar la pared celular, son importantes porque sostienen el DNA en la replicación.

No hay membrana nuclear. Se pueden observar algunas vesículas (sin membrana, con 3 capas, sólo con membrana proteica), que dependiendo de lo que lleven se llaman de una forma u otra.

CÁPSULA: Capa externa a la pared celular (también es una capa mucilaginosa). Está compuesta por una sustancia gelatinosa que se observa con tinción negativa, aunque su composición varía según el tipo de microorganismos. Formada también por polisacáridos (las externas fijan cierto microorganismo patógeno a tejidos específicos).

Su presencia está relacionada con la patogeneidad, y hace mucho más difícil la acción de las células fagocíticas del sistema inmunológico. Algunas bacterias desarrollan el glicocalix cuando viven en medio de sacarosa, formando dextranos, y estos dextranos son los responsables de las caries. Además, favorecen la resistencia a componentes antibacterianos.

En streptococcus pneumoniae se han comprobado 2 tipos de células: unas con cápsula y patógenas (colonias

mayores con borde liso) y otras sin ella (colonias pequeñas con borde irregular).

PARED CELULAR: Es la responsable de la estructura de la célula, ya que la membrana plasmática no es suficientemente rígida para controlar la presión osmótica del interior.

Su componente principal es la **mureína**=peptidoglicano=glicopéptido. Este componente es una estructura formada por largas cadenas de aminoazúcares (N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico) unidos mediante enlaces $\beta(1 \rightarrow 4)$

.

Del N-acetilmurámico cuelga una estructura de tetrapéptido con 4 aminoácidos (L-alanina, ácido D-glutámico, ácido mesodiaminopimélico con ácido D-alanina).

La cadena se une a otras por un enlace peptídico al ácido diaminopimélico con la D-alanina terminal de otra cadena.

A mayor número de uniones, mayor

estabilidad, más complejo resulta

la estructura de la mureína

Esta unión es diferente en bacterias:

GRAM+ unión a través de un puente de 5 glicinas. El ácido diaminopimélico se sustituye por la L-Lys en algas.

GRAM- unión directa en los aminoácidos.

Las GRAM+, forman una capa de mureína más gruesa, con muchas uniones (90%), mientras que en los GRAM- sólo constituyen el 5-20% de la pared.

Podemos diferenciar las GRAM + y -, ya que las GRAM+ se tiñen todas con colorante y, al decolorar durante 5' con alcohol no se decolora por completo, mientras que en las GRAM- si se puede.

La mureína=peptidoglicano=glicopéptido forma un componente que está presente en todas las eubacterias --> bacterias (arqueobacterias --> archea). En las arqueobacterias también hay pared, pero no hay mureína. Hay arqueobacterias que presentan una pared celular con una estructura similar a la mureína --> pseudomureína que está compuesta por aminoazúcares (N-acetil-tarosaminurónico y N-acetilglucosamina). De ella cuelga también otra cadena de aminoácidos (Glu, Ala, Lys, Glu). También como las anteriores se unen a otras cadenas por enlace peptídico. (% Lys y Glu terminal).

Otra diferencia es que las uniones entre aminoácidos en mureína son $\beta(1 \rightarrow 4)$ y en la pseudomureína $\beta(1 \rightarrow 3)$

. Esto hace que las archeas sean diferentes al resto de las eubacterias. Las arqueobacterias son resistentes a una enzima denominada **lisozima** (destruye paredes celulares), que sólo ataca al enlace $\beta(1 \rightarrow 4)$, también resiste a la penicilina (ataca a la D-ala terminal, para evitar que se unan). Como en arqueobacterias no existe D-alanina (no ataca) por eso la penicilina afecta sólo a las moléculas que están creciendo.

Dentro de las arqueobacterias, algunas forman también paredes celulares de estructura proteica, que dan gran rigidez --> también existen GRAM+ y GRAM-.

En la **GRAM+**, el 10% restante (90% es mureína) está ocupado por ácidos teioicos, que son polímeros de polialcoholes como el glicerol fosfato. Se unen por enlaces covalentes a la estructura del peptidoglicano y tienen carácter antigénico.

En las **GRAM-**, la estructura de la pared es mucho mayor en cuanto a la complejidad (tiene una pared mucho menor, 5-10%) y por encima de esta capa de mureína tiene una estructura más compleja, que se denomina **lipopolisacárido** --> formado por una doble capa de fosfolípidos (ambos tienen diferentes estructuras).

– la parte interna es la que se denomina Lp A, que es una región hidrófoba y que en lugar de los ácidos grasos típicos; tienen ácidos grasos no saturados.

Unido a la Lp A hay una región celular denominada "núcleo polisacárido"=core --> formado por uniones de azúcares que son relativamente raros, como son las luptosas y un compuesto denominado ácido dioxioctámico.

Por último, tenemos al otro polisacárido, que es la región hidrofílica, que también está formado por azúcares iguales. El lipopolisacárido es el componente mayoritario de la pared, y proporcionar a la pared propiedades antigénicas y constituyentes. Las endotoxinas están únicamente presentes en las GRAM- (que son las únicas que tienen lipopolisacáridos).

FLAGELOS: Son estructuras externas a la pared celular, muy largas y finas, que tienen finalidad motora. Tienen diferentes partes:

– **filamento axial**, es el filamento que sale a la superficie. Está compuesto por proteínas denominadas **flagelinas** --> compuestas de aminoácidos que presentan una composición rara, pocos aminoácidos aromáticos pero los mayoritarios son ácido aspártico o glutámico.

– **gancho**, estructura con esa forma, próximo a la pared celular. Está formado también por flagelina.

– **Cuerpo basal**, hacia el interior. Es una estructura compleja, formada por una serie de anillos que se sujetan en la pared celular. En las bacterias GRAM+ existen sólo 2 anillos, que se localizan dentro de los péptido glicanos.

En las GRAM- existen 2 pares de anillos: 2 ext. en el lipopolisacárido y 2 más ext. en la mureína.

El movimiento del flagelo se produce cuando se mueven en sentido contrario los discos, tienen que estar más sujetos, en las GRAM+ sólo con dos se anclan bien (más gruesa) pero en las GRAM- se necesitan más discos para que les de buena fijación.

Para que el flagelo sea funcional, necesita ser lo suficientemente largo. Además, es indispensable para el movimiento.

Otras estructuras filamentosas son las **FIMBRIAS, PELOS O PILI**; no intervienen en la movilidad. Existen diferentes tipos, aunque de algunos no se conoce aún la función (pueden facilitar la adhesión a células de tejidos determinados). Están constituidos por proteínas llamadas **pilinas**.

Algunos de estos están relacionados con procesos de material genético, como la **conjugación** --> existe contacto físico entre 2 células, y se realiza por la unión de una de estas estructuras con otra bacteria. A través de ella pasa un trozo de material genético a la otra célula.

MEMBRANA CELULAR=MEMBRANA PLASMÁTICA=MB. CITOPLÁSMICA: Lo que delimita a la célula. Es una estructura delgada (más o menos 8 nm de ancho) que separa la célula del exterior. Al ppio se

observó que existían células con estructuras que tenían aspecto de triple capa (2 claras y 1 interna oscura) --> **estructura trilaminar o unidad de membrana** (existe en todas las células).

Cada una de las 3 capas está formada por una doble capa de fosfolípidos de glicerol + fosfato.

Cuando ponemos el glicerol-P en un medio acuoso, se ordenan formando esta doble capa --> 3 capas.

Esta ordenación da una estructura denominada **estructura del mosaico fluido**, estructura que no es rígida, sino fluida, flexible, que permite a la membrana variar su configuración. Intercalados hay fosfolípidos y además, existen diferentes tipos de proteínas.

Esta membrana está en todas las células, pero dependiendo del microorganismo, los lipopolisacáridos van a ser diferentes.

- **Bacterias o eubacterias**, ácidos grasos no ramificados, que se unen al glicerol con una unión tipo ester (–CO–O).

- **Arqueobacterias o Archeas**, ramificados con unión tipo eter al glicerol (–O– O). Es más estable, y además, el hecho de que los ácidos grasos sean ramificados, hacen que la membrana sea menos fluida (más resistente). (Las archeas viven, generalmente, en ambientes extremos).

FUNCIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

- Transporte de nutrientes o producción de desechos. Hay una necesidad de ser atravesada por sustancias nutritivas y de desecho. Si la membrana no pudiera transportar y fuera sólo permeable, como en el interior hay una mayor [solutos], por osmosis el agua tendería a entrar (provocando una explosión de la célula). Existen así unas proteínas que ayudan en el transporte: **proteínas de transporte**.

Existen varios tipos de estas proteínas, cada una funcionando de manera diferente:

- **UNIPORTADORAS**, a través de la proteína, la sustancia pasa del exterior al interior.

- **De COOTRANSPORTE**, son necesarias dos sustancias para que se produzca la incorporación de la sustancia que nos interesa. Hay dos tipos:

- **simportadoras**: las dos sustancias – **antiportadoras**: la sustancia que

realizan el paso en la misma direcc. queremos va en una dirección, y la

portadora en otra diferente.

Existen proteínas específicas, para cada tipo de sustancia. Cuando la proteína se pone en contacto con la sustancia, se produce un cambio en la conformación de la proteína que permite el paso.

En el interior de la membrana (en procariotas) existen prolongaciones o invaginaciones de la propia membrana hacia el interior, son los denominados **MESOSOMAS**.

Estas estructuras tienen diferentes localizaciones:

- Zonas centrales y laterales generalmente.

- Normalmente son más numerosas en GRAM+ que en GRAM–.

CENTRALES: participan en la reproducción de la célula, ayudando en la duplicación del ADN y en la formación del septo que divide a la célula en dos.

LATERALES: son el lugar de formación de enzimas que produce la célula, y que son expuestas al exterior. Es en uno de estos mesosomas donde se ha detectado la producción de una enzima, (beta-lactanasa=penicilanas) que da resistencia a la penicilina (a los beta-lactanidos en general).

****Estas características se suelen cumplir en los mesosomas laterales**** Otros, tienen en su interior el sistema de transporte de electrones de la cadena respiratoria, se los compara con la mitocondrias de eucariotas.

También pueden tener pigmentos fotosintéticos, tilacoides, que se piensa que son comparables a cloroplastos de eucariotas, los responsables de la fotosíntesis.

En células procariotas en corte al microscopio:

Aparecen **vesículas** rodeadas por membrana que no se parece a la plasmática (sólo compuesta por proteínas), es una especie de pseudomembrana. En su interior (las vesículas) existen diferentes componentes, y reciben el nombre dependiendo de lo que tengan en su interior. (gas --> flotación (vesícula de gas)), pigmentos fotosintéticos, diferentes enzimas, entre las que destacan: **carboxisomas**, llevan CO₂ de bacterias autótrofas.

Otras vesículas tienen la función de almacenar sustancias de reserva: Polihidroxibutarato (vesícula de PHB), para la obtención de Carbono y Energía; Glucógeno o polifosfatos: corpúsculos metacromáticos. (teñidos con colorantes simples, como el azul de metileno, dan una coloración más intensa).

Otras estructuras son los **RIBOSOMAS**, que realizan biosíntesis de proteínas. Se disponen por todo el citoplasma. No están asociados a ninguna estructura membranosa. Están formados por RNA y proteínas: tiene una estructura formada por dos subunidades de diferente tamaño. El tamaño total del ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación de 70S. (Subunidad grande: 50S, con RNA de 23S y de 5S; Subunidad pequeña: 30S, con RNA de 16S y proteínas de Pm pequeño.

En archeas la estructura es igual, pero cuando se estudió el RNA 16S, se observó que había diferentes porcentajes en las secuencias de las células procariotas y las eucariotas. Las bacterias, como ya sabemos, se pueden dividir en: bacterias --> eubacterias y archea --> arqueobacterias.

REGIÓN NUCLEAR: No existe def. de núcleo, es un acúmulo de una doble cadena de ADN largo apilado en una parte del citoplasma, denominada región nuclear. Este ADN, que constituye el cromosoma bacteriano, se denomina **genóforo**.

Además del genóforo, existen moléculas de DNA doble circular, muchísimo más pequeñas, denominadas **plasmidios** (también pueden replicarse). Se sabe que la información genética que transmiten estos plasmidios no es esencial para la bacteria. Las bacterias pueden vivir sin ellos, sólo sirven para favorecer algo a la molécula --> algunos transmiten la resistencia a algunos antibióticos (de otros no se conoce la función).

ENDOSPORA O ESPORA BACTERIANA: Son las formas de resistencia de algunas bacterias, principalmente, Bacillus, Clostridium y las GRAM+.

Se forma cuando la célula bacteriana comienza a percibir que se le agotan los nutrientes. Lo primero que hace es adquirir mayor movilidad, para lo cual sintetiza más flagelos (con lo que puede desplazarse para buscar nuevos alimentos). Después, comienza la formación de la **endospora**, que tiene una duración totalmente determinada. Fases de la formación de la endospora:

1.- Primero se produce la **duplicación del ADN**.

2.- Después comienza a **formarse el septo de la espora**, que es una invaginación de la membrana. Con el septo, la célula queda dividida en dos partes:

- la futura espora
- otra parte con DNA que acabará degenerando

3.- Se forman las **membranas de la espora**: una externa y otra interna.

EXTERNA: prolongación de la mb. plasmática de una zona de la célula.

Entre las dos membranas se desarrolla una estructura llamada **corteza primordial o CÓRTEX**. Está formada por proteínas, que son las responsables de la resistencia de las esporas a los factores ambientales adversos.

4.- Se forma el **exosporio**, que es una estructura amorfa que se coloca externamente a las dos mitades de la endospora.

5.- Se forman las **envueltas de la endospora**, se produce la incorporación de cationes Ca^{2+} y se sintetiza un compuesto, el **ácido dipicolínico**, que sólo aparece en las endosporas de las bacterias.

Los Ca^{2+} reaccionan con el ácido dipicolínico y dan lugar al DIPICOLINATO CÁLCICO, que forma una estructura calcarea que proporciona resistencia.

6.- Se terminan de formar las envueltas con las **capas corticales**.

7.- La endospora queda libre con la **lisis de la célula**.

Las endosporas son resistentes a compuestos químicos, a la desecación prolongada, a temperaturas extremas, etc.

Con la información genética de la endospora, se formará una célula vegetativa cuando las condiciones dejen de ser adversas.

IECCIÓN 4: Estructura y función de la célula de los Microorganismos Eucariotas

PROPIEDADES IMPORTANTES:

- Es una estructura compleja, en comparación con las procariotas.
- Su tamaño es mayor.
- Está delimitada por la membrana plasmática, con estructura de unidad de membrana --> estructura trilaminar.
- En el interior aparece un núcleo diferenciado, separado del resto del citoplasma por la membrana nuclear.
- Aparecen numerosos sistemas membranosos, que constituyen el Retículo Endoplasmático, que puede ser RE Liso y RE Rugoso.
- El Aparato de Golgi está formado por un conjunto de sacos aplanados.
- Existen unas estructuras rodeadas de membrana, en cuyo interior hay crestas e invaginaciones -->

Mitocondrias.

- Hay también pequeñas vesículas rodeadas de membrana.
- Otras formas de mayor tamaño y con un contenido menos denso que las anteriores son las vacuolas.
- Hacia el exterior aparecen prolongaciones para la movilidad de la célula, los famosos flagelos o cilios.

PARED CELULAR: No aparece en células eucariotas de animales superiores ni en protozoos. Si aparece en algas y vegetales superiores, pero su estructura es diferente a la pared celular bacteriana.

En **algas** --> la gran mayoría poseen una pared formada por un polímero de glucosa, la **CELULOSA**, que es un polímero con uniones beta 1-->3.

Las moléculas de glucosa forman cadenas muy largas que interaccionan y se entrelazan dando lugar a una estructura ancha, de modo que se trata de una pared celular muy rígida.

Las algas diatomeas poseen una pared compuesta por sílice.

Los **hongos filamentosos** pueden tener celulosa o bien una pared denominada **GLUCANO**, formada por unidades de glucosa con enlaces beta 1-->4. Esta diferencia en la unión de la glucosa, hace que las paredes de glucano sean diferentes a las de glucosa, ya que las de glucano no son tan rígidas, son menos compactas.

Otros hongos, poseen **QUITINA**. Forman un polímero de la N-acetilglucosamina. Es el mismo compuesto que forma el exoesqueleto de los insectos. Su membrana plasmática está constituida por la doble capa de fosfolípidos. En el caso de las eucariotas, los lípidos que se unen al glicerol son los esteroides, los cuales no aparecen en procariotas.

En los hongos filamentosos es el ERGOESTEROL.

En las células animales es el COLESTEROL.

Hacia el exterior de la célula hay unas estructuras que sólo se diferencian en su longitud, y que intervienen en la movilidad de la célula: **cilios y flagelos**.

CILIOS Y FLAGELOS: Su estructura es muy diferente a la de los cilios y flagelos en procariotas. Poseen una estructura mucho más compleja:

Aparece una forma redondeada rodeada de membranas, en cuyo interior aparecen una serie de estructuras formadas por **microtúbulos** en diferente número.

En el centro aparece un par de microtúbulos **CENTRALES**, que se prolongan por todo el flagelo y terminan a nivel de la membrana plasmática. En el interior de la membrana aparece el **cuerpo basal**.

El resto de los microtúbulos continúan por el interior de la membrana plasmática hasta el cuerpo basal. Hay 9 pares de microtúbulos laterales. Todos están constituidos por **TUBULINA**, cada par tiene unas estructuras con forma de ganchos, que están compuestos por **DIENINA o dineína**. Los pares aparecen unidos entre sí por otra estructura proteica --> la **ALEXINA**.

Entre cilios y flagelos la única diferencia es la longitud. La movilidad se debe a contracciones de los microtúbulos, para lo cual se necesita ATP.

En el interior de la célula encontramos las siguientes estructuras:

VESÍCULAS: Se caracterizan por poseer un material denso. También son llamadas **MICROCUERPOS**. Están rodeadas de membrana y su contenido es variable.

La célula las utiliza para almacenar enzimas esenciales, que es necesario tener guardadas y aisladas del resto del citoplasma.

Según el contenido de estas vesículas, reciben diferentes nombres:

- **LISOSOMAS:** enzimas hidrolíticas, como la fosfatasa ácida.
- **GLIOXISOMAS:** enzimas del ciclo del glioxílico.
- **PEROXISOMAS:** enzimas como la peroxidasa, encargada de desdoblar el agua oxigenada (formada como consecuencia del metabolismo y que es tóxica para la célula).

VACUOLAS: Son de mayor tamaño y también están rodeadas de membrana. La célula las utiliza para almacenar productos de desecho.

RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO: Presenta una serie de membranas. Unas veces está asociado a ribosomas y otras no. Los ribosomas del RE Rugoso, son los encargados de la síntesis proteica. Estas proteínas se liberan hacia el interior del RER y a partir de éste pueden:

- ser englobadas en vesículas o microcuerpos.
- atravesar todo el sistema y situarse hacia el exterior de la célula.

APARATO DE GOLGI: Son sacos aplanados que se localizan cerca de la membrana plasmática. Su función es el transporte de compuestos, sobre todo de polisacáridos y carbohidratos.

En los hongos filamentosos interviene en la síntesis de la pared celular de la hifa --> crecimiento apical de ésta.

MITOCONDRIAS Y CLOROPLASTOS: Las **mitocondrias** son orgánulos de tamaño variable. Son más numerosas cuando la célula está en pleno crecimiento.

Tienen una membrana interna que posee plegamientos hacia el interior, formando crestas, y además tienen una membrana externa continua.

El interior recibe el nombre de **matriz mitocondrial**. En la matriz tiene lugar el ciclo de Krebs, y en las crestas se produce la fosforilación oxidativa.

Los **cloroplastos** poseen en su interior unas invaginaciones. Aparecen en las células vegetales. Están formados por una membrana externa y en el interior aparecen unos sacos aplanados, los denominados **TILACOIDES**. A un conjunto de tilacoides se les llama **GRANA**.

Los cloroplastos intervienen en el proceso de la fotosíntesis. La fase luminosa se produce en los tilacoides y la fase oscura en la matriz.

RIBOSOMAS: Son diferentes a los de la célula procariota. Poseen un tamaño con un coeficiente de sedimentación 80S.

Se divide en dos subunidades: 60S y 40S.

Cada subunidad está formada por RNA y proteínas.

Subunidad 60S	Subunidad 40S
RNA 23S	RNA 16S
RNA 5S	Proteínas S
RNA 5,8S	
Proteínas L	

IECCIÓN 5: Cultivo y Crecimiento de Microorganismos

Una característica de los microorganismos es que pueden cultivarse en un medio puro, y cultivarse en el laboratorio. Para ello necesitamos saber los nutrientes necesarios para dicho microorganismos, así como las condiciones físicas en que se desarrollan.

Los nutrientes necesarios son:

1.- Fuente de energía, pudiendo ser:

- luz solar=autótrofos
- compuestos químicos=heterótrofos

2.- Fuente de carbono, pudiendo ser:

- inorgánica=autótrofos
- orgánica=heterótrofos

3.- Fuente de nitrógeno

- inorgánica – (las plantas) KNO_3
- orgánica (proteínas y aminoácidos)

4.- Sales

- **Azufre (S)**, las plantas usan compuestos inorgánicos y los animales usan compuestos orgánicos azufrados (aminoácidos). Las bacterias usan ambos tipos de compuestos.
- **Fósforo (P)**, inorgánicos u orgánicos (fosfatos).

5.- Oligoelementos: Na, K, Mn, Mg, Fe, Zn, Cu, Co, Ca,...

Son necesarios para poder desarrollarnos, aunque aparecen en una pequeña proporción.

6.- Vitaminas

- animales: a través de la dieta.

– microorganismos: o lo sintetizan o necesitan un aporte externo. Entre los que lo sintetizan, una de ellas vive en nuestro intestino (E. Coli) y producen vitamina K.

7.- Agua

Para hacer crecer microorganismos en el laboratorio necesitamos un medio de cultivo, es decir, una disolución con todos los nutrientes.

Podemos diferenciar los medios de cultivo según el estado físico:

- **Medios líquidos**, en agua todos los nutrientes.
- **Medios sólidos**, se añade un agente solidificante --> **AGAR** (15–20 g/l)
- **Semisólidos**, con menos **AGAR** (+/- 5 g/l)

Hay que tener cuidado, un exceso en alguno de los componentes puede inhibir el crecimiento de los microorganismos.

También podemos clasificarlos según su composición:

- **Medios sintéticos**, medios en que los nutrientes están químicamente diferenciados y en unas condiciones determinadas.
- **Medios complejos**, aunque sepamos la composición, no sabemos en que proporción están.
- **Medios semisintéticos**, medios con un sólo compuesto complejo, y los demás comp. conocidos. El Agar nutritivo es de este tipo porque lleva carne.
- **Medios enriquecidos**, aquellos a los que añadimos una sustancia compleja, de gran aporte de vitaminas, como puede ser sangre, suero, extracto de tejidos... esto se hace para soportar el crecimiento de organismos más complejos, nutritivamente hablando.
- **Medios selectivos**, algunos componentes van a hacer que se desarrolle más un determinado microorganismo que otro. Ejemplo: las sales biliares favorecen la formación de bacterias GRAM–.
- **Medios diferenciales**, algunos componentes del medio hacen que un tipo determinado de microorganismos tengan aspecto diferente al resto de los microorganismos. El Agar Levine inhibe el crec. de bacterias GRAM+. Las bacterias E. Coli, tienen un color característico en este medio, toman un color verde metálico.

Estos microorganismos podemos cultivarlos como un cultivo puro. Generalmente se realizan en **placas petri**. Para obtener un cultivo puro podemos realizamos lo siguiente:

1. **Siembra por extensión**: la muestra con microorganismos se pipetea sobre la superficie del agar (0,1ml o menos) y se extiende suavemente con un asa de vidrio. Se pone a una temperatura adecuada y se deja un determinado tiempo hasta que aparecen diferentes colonias.
2. **Siembra por vertido en placa**: la muestra con microorganismos se pipetea en una placa estéril y sobre ella se añade el medio de cultivo y se mezcla. Después de incubar, sobre la superficie del medio de cultivo aparecerán colonias de los diferentes microorganismos.

Para asegurar que lo que hemos obtenido es puro, usamos el método de **AISLAMIENTO EN ESTRÍA** -->

consiste en coger la muestra de la colonia con un asa de siembra, y haciendo estrías se coloca en otra placa petri. Al extender de esta forma, quedarán bacterias sueltas que originarán colonias aisladas.

A partir de estas colonias que podemos apreciar que son idénticas, las pasamos a un tubo con agar inclinado (para que tenga mayor superficie) y obtenemos así el cultivo puro.

Mantenimiento y Conservación de

MICROORGANISMOS

La manera más sencilla es realizar **resiembras periódicas**, que consiste en pasar a otro tubo con medio de cultivo. Se realiza cada 2, 3, 4 meses con pocos microorganismos.

Para aumentar el tiempo y el porcentaje de resiembra neto, los tubos en la nevera están a una temperatura cercana a 4°C, con ello conseguimos un descenso del metabolismo y hacemos que los microorganismos crezcan más lentos. A bajas temperaturas los microorganismos podrían durar años. Para evitar que se rompan las células al congelar, podemos usar "**amortiguadores**" como el glicerol o el aceite de parafina.

El otro método de conservación es la **liofilización**, en la que hacemos pasar de agua sólida a gas sin pasar por lo que congelamos los microorganismos, después calentamos hasta tener vapor --> el microorganismo está sin agua pero con sus estructuras intactas: cuando lo ponemos en un medio de cultivo con agua se hidrata de nuevo, y vuelve a su estado normal. Esta es la manera más utilizada a la hora de conservar microorganismos.

Existe también lo que se conoce como **colección de cultivos tipo**, en países desarrollados. Consiste en una colección de microorganismos que recogen los científicos --> cuando se encuentra una cepa aislada y se nombra, hay que mandarla a la CCT, que se encarga de mantener la cepa y de tenerla a disposición de todo el mundo (que autorice algún laboratorio). En España es la C.E.C.T. (la más importante es la americana, la ATCC), que emite boletines periódicamente con los nombres de los microorganismos.

CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS

El microorganismo comienza a crecer, aumentando su tamaño y termina dividiéndose en dos células idénticas a la primera.

Definimos el **CRECIMIENTO** como un aumento ordenado de los componentes de la célula, de manera que una duplicación de masa se corresponde con una duplicación de todos los componentes de la célula, se llama **división binaria**. Al tiempo que tarda una célula en duplicarse se le llama **tiempo de generación=tiempo de duplicación**. Este tiempo va a depender de las condiciones en que tengamos el microorganismo, al igual que del tipo de cultivo o, genéticamente, de la velocidad metabólica.

Ejemplo: E. Coli --> 20 minutos, y por el contrario Mycobacterium --> varios días

****IMPORTANTE**** Cuando hablamos de crecimiento de microorganismos, nos referimos al crecimiento de toda la población.

MEDIDA DEL CRECIMIENTO (Métodos para el estudio del crecimiento)

Se puede hacer de varias formas distintas:

– **Determinando el número de células:** se hace un recuento total. Es el método más sencillo y directo. Consiste en contar a ojo (microscopio) el número de células que hay (para los glóbulos rojos se utiliza un cuentaglóbulos, con una rejilla calibrada con un área de 1mm²).

Contamos los microorganismos existentes en cada cuadrado y luego hacemos una media de todos los cuadrados grandes que hay: los microorganismos que contemos estarán en un volumen de 0,02 mm³. Así, sabiendo esto podemos calcular el número de microorganismos que tenemos en el volumen que deseamos.

Inconvenientes (como no): pesadez de contar (cuando son muchos te kagas!!!). Otro problema es que no podemos diferenciar los organismos vivos de los muertos.

– **Recuento electrónico:** mediante el **contador Coulter**. Consiste en pasar un volumen determinado de la muestra con microorganismos por un tubo, que tiene unos orificios tan pequeños, que sólo permite el paso de las células una a una.

Se establece así una corriente de electrones y se mide la conductividad. A medida que pasan bacterias, la conductividad varía. Así, se cuentan las variaciones de conductividad sufridas. (número de microorganismos x 1000)

Inconvenientes: los microorganismos filamentosos se unen unos con otros, no pudiendo diferenciar el porcentaje de microorganismos vivos y muertos.

Como el problema de diferenciar los microorganismos vivos y muertos está presente en los dos métodos, surge otro método que nos soluciona el problema.

RECuento DE VIABLES: con él podemos diferenciar los microorganismos muertos de vivos. Se cuenta el número de células que están vivas y por lo tanto que puedan desarrollarse en un medio de cultivo, para ello tenemos que tener entre 30 y 300 microorganismos. (con un número inferior/superior a éstos no podemos realizar este método)

Realizamos un paso previo, las llamadas **diluciones seriadas o decimales**, que consiste en que en vez de coger la muestra directamente, la diluimos y tomamos un 1ml que añadimos en diferentes tubos (que van a contener 9ml de diluyente). Ahora, tomamos 1ml de este primer tubo y se añade en el siguiente, y así hasta 6 diluciones. Es entonces, a partir de cada una de estas diluciones, desde donde vamos a inocular las placas con el medio de cultivo para hacer el recuento.

Las dos primeras muestras contienen más microorganismos, y es bastante difícil poder contarlos (contienen alrededor de 300). En las dos siguientes muestras, hay +/- 157 colonias; mientras que en la siguiente tenemos 17 colonias... por lo que esta última dilución no nos vale porque tenemos menos de 30 colonias.

Elegimos entonces la dilución de 10⁻³ que tiene alrededor de 59 colonias (porcentaje comprendido entre 30 y 300). Originariamente tendríamos 1,59.10⁵ (por 10⁻³ veces la muestra --> ya que diluimos 3 veces). Esto se expresa como **unidades formadoras de colonias**, que es la unidad de medida.

muy pocas

Mayor número de bacterias tomamos de esta dilución. En realidad

tendríamos, originariamente, el número de bacterias que encontremos aquí por 10³ (ya que lo hemos diluido 3 veces)

– **Técnica del número más probable:** se usan tablas. A partir de la muestra originaria, vamos a hacer diluciones. Generalmente usamos las tres primeras diluciones para inocular los tubos (3 ó 5). Lo inoculamos a temperatura y condiciones adecuadas --> en los tubos turbios tenemos más microorganismos. Anotamos los tubos turbios, por ejemplo 5:3:1 y buscamos este número en las tablas --> entonces las tablas nos dan el número más probable de microorganismos que hay.

– **Aumento del número de células=aumento de masa celular:** para determinar la masa celular, lo más sencillo es determinar el peso seco (sin agua retenida), para ello tomamos una muestra que colocamos en un pequeño recipiente (del que ya conocemos el peso) y aplicamos calor (90°C) hasta llegar al peso cte. (24–48h) --> luego volvemos a pesar y por diferencia de pesada, calculamos los mg de masa de microorganismo que tenía en la muestra.

– **Medida de la P**

–**óptica:** cuando hacemos pasar la luz por la muestra, choca con las partículas y se dispersa. Esto lo hacemos con espectrofotómetro, que mide la luz dispersada. La inversa de la luz dispersada es lo que se denomina **P óptica**.

Tenemos que a mayor **P óptica** mayor número de microorganismos hay

La **P óptica** aumenta al aumentar el tiempo (porque los microorganismos crecen)

La **P óptica** puede relacionarse con el peso seco: por ejemplo...

tenemos una **P óptica** de 0,2 -----> peso de la muestra 3 mg/ml

O con el número de viables...

P óptica de 0,2 corresponde a 3.107 viables

Cuando representamos esta variación del crecimiento a lo largo del tiempo, obtenemos una gráfica característica denominada **CURVA DE CRECIMIENTO**.

Esta curva tiene una serie de fases con diferente crecimiento:

– **F. de latencia**, hay un crecimiento más lento, ya que cuando ponemos a un microorganismo en un medio, necesita un tiempo para adaptarse. Este tiempo es variable, y depende del microorganismo y de las condiciones en las que lo ponemos.

– **F. exponencial=logarítmico**, los microorganismos se duplican exponencialmente (cada división constituye una duplicación de la población). Durante esta fase de crecimiento, la velocidad de crecimiento es constante (corresponde a la pendiente).

– **F. estacionaria**, parece que el crecimiento se mantiene estacionario. Ocurre porque los microorganismos han agotado los recursos del medio de cultivo --> ocurre un crecimiento desequilibrado y los compuestos se sintetizan a diferente velocidad, formándose células con alteraciones (son células más pequeñas y no visibles).

– **F. muerte= lisis**, (porque se rompe la pared celular). Las células no pueden seguir sin nutrientes y se mueren después de la fase exponencial.

Al final de la fase estacionaria se pueden formar **metabolitos secundarios**, que son importantes para el hombre en muchos casos --> **MEDICAMENTOS**.

Otras veces, las curvas son de otro tipo, que parecen diferentes curvas superpuestas. Se debe a que en la

composición del medio de cultivo, hay más de una fuente de C y N.

Crecimiento Diauxico: se debe a que en

el medio hay más de un complejo de C y N

Otras veces, en vez de metabolitos, necesitamos que el microorganismo aumente de masa con mayor rapidez. Hacemos que siempre tengan un crecimiento exponencial (añadiendo más cultivo) --> se denomina **CULTIVO CONTINUO**. Para ello usamos un quimiostato, que tiene una zona de entrada y otra de salida.

El microorganismo adapta la velocidad de crecimiento a la velocidad con que se añade el cultivo, y nunca podemos añadir más medio de cultivo que la velocidad a la que se dividen; porque al final no tendremos manera de evitar que el líquido entre a más velocidad.

Para evitar que el líquido entre con más velocidad se usa lo que se denomina **turbidestato** --> para medir la turbidez. Se hace con el espectro fotómetro y será una determinada cantidad de **P óptica**, la que nos diga cuando añadiremos más medio.

Además del medio de cultivo, hay otros factores que intervienen en el crecimiento de microorganismos --> no todos responden igual a un mismo factor ambiental. Estos factores son los denominados **factores fisicoquímicos**.

– **TEMPERATURA:** al disminuir la temperatura disminuimos también el metabolismo, con lo que podemos regular el crecimiento de estos con variar la temperatura. La temperatura con respecto al crecimiento de microorganismos puede ser:

- **Mínima**, por debajo de ella no pueden crecer microorganismos.
- **Media**, óptima para el crecimiento.
- **Alta**, por encima no se desarrollan.

Dentro de la temperatura óptima tenemos:

- **Estenotermófilos**, tienen una temperatura óptima muy marcada (se notan mucho las variaciones de temperatura).
- **Euritermófilos**, la temperatura óptima no está tan marcada.

Según el rango de temperatura que tenemos, los microorganismos se pueden clasificar en:

- **Psicrófilos**, crecen a temperaturas inferiores a 0°C y máximas de 20°C, siendo la temperatura óptima de 10°C–16°C.
- **Mesófilos**, temperaturas moderadas (20°–45°) con temperatura óptima entre 30°–37°C. Dentro de ellos están todos los microorganismos patógenos para el hombre (importante la temperatura óptima de estos, temperatura corporal...).
- **Termófilos**, se desarrollan bien a partir de no más de 70°C y con una temperatura óptima de 60°C.
- **Heteromófilos**, temperaturas mayores de 70°C y con una temperatura óptima de 86°C.

- **Termófilos extremos**, temperatura óptima de 105°C.

Tanto los termófilos como los psicrófilos, tienen sistemas enzimáticos que no se desnaturalizan a 60°C --> otras enzimas si se se desnaturalizan a estas temperaturas.

– AGUA:

Si ponemos un recipiente con agua y cerramos herméticamente, el agua se evapora y podemos tener 100% de humedad relativa. Si se añade ClNa, a lo mejor sólo llegamos al 80% de esta humedad relativa.

$$80\%/100\%=0,8 \text{ actividad de agua}$$

Los microorganismos no se pueden desarrollar con $a_w < 0,9$ (90% humedad relativa), aunque levaduras y hongos filamentosos son un poco menos resistentes (valores algo menores).

El hombre usa esto para conservar alimentos, como por ejemplo la salazón, que consiste en quitar el agua y por eso los microorganismos no pueden crecer, o la mermelada, que consiste en quitar el agua con azúcar.

Normalmente las bacterias necesitan una mayor cantidad de agua (hongos filamentosos menos de 0,9) ninguno puede desarrollarse a menos de 0,6.

Según la capacidad de necesitar este agua podemos encontrar:

- **microorganismos osmotolerantes**: soportan a_w muy bajas.
- **microorg. osmófilos**: crecen a a_w muy bajas, pero les es necesario una cierta [solutos]]. Dentro tenemos una mayor [NaCl] para desarrollarse. Según estas [NaCl] podemos clasificar los microorganismos en:
- **no halófilos**, no soportan [NaCl] $> 0,1$
- **halotolerantes**, soportan [NaCl] entre 1–6%, pero si no las tienen da igual
- **halófilos**, necesitan que la [NaCl] sea mayor del 6%, entre 6–15%
- **halófilos extremos**, necesitan [NaCl] entre 15–30%

Los dos últimos tipos de microorganismos se incluyen en la familia **Halobacteriaceae** (dentro de las archeas), que son microorganismos que viven en las aguas marinas (lugares donde es posible alcanzar esas []).

– **PRESIÓN HIDROSTÁTICA**: microorganismos de aguas profundas, que soportan la presión de todo el agua que hay por encima. Dependiendo de la presión que son capaces de soportar tenemos:

- **barófilos**, soportan presiones $>$ presiones atmosféricas
- **barotolerantes**, si la $P >$ Presión atmosférica, podemos vivir, pero si no hay esa presión no importa.
- **barófilos**, necesitan esta presión para poder crecer y desarrollarse
- **pH**: es la medida de la acidez o la alcalinidad de un medio en el que hay microorganismos. La gran mayoría de los microorganismos se desarrollan mejor a pH neutro (± 7), pero todos los microorganismos presentan un **pH mínimo**, por debajo del cual no pueden crecer, un **pH óptimo** en el que se desarrollan más rápidamente, y un **pH máximo** por encima del que no se desarrolla.

- **acidófilos**, pH mín=1, pH óptimo=3, pH máx=5
- **neutrófilos** (mayoritarios), pH mín=5, pH óp=7, pH máx=8
- **basófilos**, pH mín=8, pH óp=16, pH máx=12

Las bacterias son más neutrófilas que levaduras y hongos (pH más bajo). El microorganismo más ácido que se conoce es el Thiobacillus (bacteria) que puede vivir a pH<1.

– **OXÍGENO:** es necesario para la gran mayoría de microorganismos, por ser el aceptor terminal de electrones de la cadena respiratoria, pero la [oxígeno] del organismo (20%) nunca es mayor que la [oxígeno] de la atmósfera (tóxicas para microorganismos). Podemos clasificar a los microorganismos por su comportamiento:

- **AEROBIOS:** necesitan oxígeno para poder desarrollarse (+/- 20%)
- **ANAEROBIOS:** no necesitan oxígeno. Podemos tener:
 - **anaerobios facultativos**, si hay oxígeno lo usan, pero si no hay también son capaces de crecer.
 - **anaerobios aerotolerantes**, no crecen en presencia de oxígeno, pero no se mueven, se quedan igual.
 - **anaerobios estrictos**, la presencia de oxígeno es tóxico para ellos.

IECCIÓN 6: Control del crecimiento MICROBIANO

Necesitamos que todo el material que usamos en el laboratorio esté en condiciones para albergar los microorganismos que queremos.

Para esterilizar, podemos matar los microorganismos, quitarlos o impedir que accedan a la muestra. Mediante la **ESTERILIZACIÓN** eliminamos todas las células bacterianas que estén en ese material. Este proceso podemos conseguirlo mediante diferentes métodos, que podemos clasificar en:

- **métodos físicos**, aplicamos procesos físicos, como son el calor, la filtración, radiaciones...
- **métodos químicos**, añadimos componentes químicos.

Métodos Físicos

- **Aplicación de calor:** (el más usado)

Puede ser: 1. Calor húmedo: se usa la autoclave.

2. Calor seco: usamos un horno Pasteur.

En el método 1, con temperaturas comprendidas entre 100–121°C, ocasionamos una coagulación de las proteínas que hace que las enzimas no sean activas. En el método 2, secamos la célula (160–180°C) --> quitamos el agua y la célula no puede desarrollarse.

Para esterilizar medios de cultivo, usamos el calor húmedo --> autoclave (olla a presión) como hay más presión hay más temperatura. Es un recipiente en el que normalmente, en la parte inferior hay una cantidad de agua que se calienta con una fuente (generalmente resistencia). Sobre el agua hay una rejilla con los matraces

que queremos esterilizar. Cuando hay más vapor, tiende a salir por un "pitorrillo" que podemos abrir o cerrar. Si lo cerramos aumentamos la presión, a una atmósfera la temperatura es 121°C, y mueren todos los microorganismos.

Este método está limitado por los materiales que queremos esterilizar (algunas se estropean a temperaturas mayores a 100°C).

Para los materiales que soportan 100°C, usamos un método denominado **Tindalización** --> consiste en esterilizar a **vapor fluente** (el vapor sale y no aumenta la presión). Lo dejamos 30 minutos a 100°C y lo dejamos ahí un día entero; después volvemos a calentar a 100°C durante 30 minutos y repetimos una vez más. Con este proceso, destruimos las formas esporulares.

Cuando esterilizamos algo que no se quiere exponer al vapor de agua (porque se mojan y se llenan de agua), usamos el **calor seco** --> aplicamos calor en el horno pasteur (recipiente en el que aplicamos calor, que se distribuye con un ventilador) obteniendo temperaturas de 160–180°C, que mantenemos durante 1–3h (dependiendo de la temperatura utilizada).

Una vez que hemos esterilizado el material, necesitamos conservarlo estéril; por lo que todos los matraces los tapamos con un algodón graso que impide que entre la humedad.

Otro proceso de aplicación de calor, pero que no es esterilización porque no mata todos los microorganismos, es la **Pasteurización**. Se usa por seguridad en microbiología de alimentos --> se calienta 60–70°C y es suficiente para eliminar muchos microorganismos, sobre todo los patógenos que pudiera haber (se utiliza sobre todo en conservación de leche, queso, zumos, fabricación de cerveza y vinos (para matar levaduras)...)

Otro método para esterilizar es la **Incineración**, que se utiliza para el asa de siembra, consiste en ponerlo directamente sobre el fuego y se logra que mueran los microorganismos. También se usa para incinerar placas petri de plástico que no vamos a usar, animales con microorganismos,...

– **Filtración:**

Quitamos los microorganismos que estén en un material líquido o gaseoso, usando filtros con tamaño de poro pequeñísimos para que los microorganismos no pasen. Se empleaba tierra de diatomeas, aunque ahora se usan filtros de tamaño de poro de 0,45–0,22 micrómetros --> no atrapan los virus.

Se usan para filtrar agua, en estudios sobre el agua. Se utiliza para esterilizar compuestos que no aguantan las altas temperaturas (enzimas, proteínas...) gases caire --> se hace pasar por filtros y sale estéril (se utiliza para habitaciones, superficies, laboratorios, quirófanos...).

– **Radiaciones:**

Pueden ser:

– IONIZANTES: rayos γ

y rayos X. Afectan a la célula y producen alteraciones tales que llegan a matarlas. Se la conoce también como esterilización fría (también la otra clase).

Los rayos γ

presentan una gran penetrabilidad por lo que pueden usarse para esterilizar instrumental que está en el interior de recipientes (por eso son difíciles de usar --> en habitaciones especiales). Las radiaciones ionizantes consisten en ionizar la célula, formando radicales $-OH$ que alteran la célula y la matan.

Los **rayos X** son menos penetrantes que los anteriores. Son menos peligrosos, aunque tienen menos uso.

– NO IONIZANTES: Actúan a nivel de DNA --> se producen uniones en moléculas de timina de las dos hebras del DNA, que hace que cuando la molécula se separe, se pierdan bases, el RNA no se traduce en la secuencia correcta --> proteínas con aminoácidos extraños, la célula muere. También es estéril fría.

Su problema es que es poco penetrante, y se usa para esterilizar superficies, líquidos con h menores a 3mm.

Generalmente se usan longitudes de onda de 200nm, que es la que más afecta al DNA (porque es la radiación que absorbe).

Métodos Químicos

Hay muchos componentes químicos que podemos usar para eliminar los microorganismos, utilizando cada uno para actuar contra algo en concreto. El más tradicional es el **FENOL** --> la actividad de otros compuestos se da referenciada a la acción del fenol.

IECCIÓN 7: Fundamentos del Metabolismo MICROBIANO

METABOLISMO: conjunto de reacciones o transformaciones químicas que ocurren en una célula o en un microorganismo. Está constituido por:

– ANABOLISMO: conjunto de reacciones químicas encaminadas a la síntesis de componentes celulares. Son reacciones de biosíntesis, que consecuentemente requieren energía.

– CATABOLISMO: conjunto de reacciones de degradación de sustancias en las que se produce (o libera) energía.

Como resultado de estos dos grupos de reacciones tiene lugar el crecimiento celular.

Una célula, para crecer, necesita sintetizar los nutrientes que tienen en el ambiente, y por biosíntesis forma los componentes celulares. Los nutrientes son fuentes de C, N, O,...

La energía que se necesita para estas biosíntesis, procede del exterior y puede ser de diversa naturaleza: luz, compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos. La mayoría de los microorganismos usan compuestos químicos orgánicos que son captados del ambiente, introducidos en la célula y degradados por catabolismo en sistemas más simples que la célula necesita (la célula los expulsa, más tarde, como productos de desecho). Esta energía se usa para el anabolismo y para otras funciones celulares, como puede ser el movimiento de los flagelos, transporte de solutos por la membrana...

Los microorganismos se puede clasificar atendiendo al tipo de metabolismo que realice. En concreto, se agrupan atendiendo a la fuente de energía que toman del medio o la fuente de C.

Dependiendo de la energía que toman del medio para crecer, tenemos:

– **luz**, fototrofos

– **compuestos químicos**, quimiotrofos. Estos a su vez se pueden dividir según sea el compuesto químico que utilizan. Ambos obtienen energía de la oxidación del compuesto químico, por tanto, obtienen energía química.

– **INORGÁNICO:** quimiolitótrofos (=litótrofos)

– ORGÁNICO: quimioorganótrofos (=organótrofos)

Dependiendo de la fuente de carbono (C) (fuente de moléculas con C para usarlo como constituyente celular), tenemos:

– **CO₂**, sintetizan los constituyentes celulares a partir de dióxido de carbono. Transforman compuestos inorgánicos en orgánicos --> **AUTÓTROFOS**.

– Utilizan **compuestos orgánicos** que **ya** han sido **elaborados** por otros organismos --> **HETERÓTROFOS**.

La mayoría de los organismos autótrofos son los que obtienen su energía de la oxidación de compuestos químicos inorgánicos o de la luz.

AUTÓTROFOS

que son litótrofos que son fototrófos

LITOAUTÓTROFOS FOTOAUTÓTROFOS

La mayoría de los heterótrofos usan compuestos orgánicos como fuente de energía:

HETERÓTROFOS

que son quimioorganótrofos

QUIMIOHETERÓTROFOS

(Heterótrofos)

FOTOAUTÓTROFOS: Usan la luz como fuente de energía y el dióxido de carbono (CO₂) como fuente de C. Este grupo incluye a: **plantas, algas, cianobacterias y bacterias verdes y rojas**.

LITOAUTÓTROFOS: Usan compuestos químicos inorgánicos como fuente de energía y dióxido de carbono (CO₂) como fuente de C. Está formado exclusivamente por **procariotas**, que pertenecen al dominio de Bacteria o al dominio Archea.

QUIMIOHETERÓTROFOS: Usan compuestos orgánicos como fuente de energía y fuente de carbono (C). Son: **animales, protozoos, hongos y la mayoría de las bacterias**.

Estos son los grupos principales (y los microorganismos están presentes en todos) pero también puede haber microorganismos de los siguientes tipos:

FOTOHETERÓTROFOS: Usan la luz como fuente de energía y los compuestos orgánicos como fuente de carbono (C) (no necesitan CO₂). Pertenecen a este grupo algunas **bacterias rojas**.

LITOHETERÓTROFOS: Usan como fuente de energía compuestos químicos inorgánicos y como fuente de carbono (C) usan comp. orgánicos. **Muchos grupos de bacterias** pertenecen a este grupo (incluso algunas de las que sintetizan el azufre (S)).

Con todos estos grupos, llegamos a la conclusión de la gran variedad metabólica de los microorganismos, que pueden usar cualquier fuente de energía y cualquier fuente de carbono. Esto tiene varias consecuencias, sobre todo para el hombre:

- Allí donde hay vida, hay microorganismos.
- Hay hábitats exclusivos donde sólo crecen microorganismos (carentes de oxígeno, de elevada acidez, con mucha salinidad, sin luz...)
- Los microorganismos tienen la capacidad de transformar su ambiente o hábitat (transforman compuestos y los expulsan como sustancias de desecho). Ejemplo: por la aparición de las cianobacterias, se realizó la fotosíntesis y se liberó oxígeno a partir del agua --> entonces, debido a estas bacterias, la atmósfera se fue cargando de oxígeno, lo que permitió la evolución de otras especies que necesitaban este oxígeno.
- Van a producir sustancias como consecuencia del metabolismo que el hombre puede utilizar. Ejemplo: industria alimenticia (fabricación de pan), cerveza; industria farmacéutica (producción de antibióticos).
- Son degradadores en el ambiente, degradan la materia orgánica, liberando elementos que pueden ser usados por otros seres vivos. Van a producir la mineralización.
- Son productores primarios: transforman el dióxido de carbono en biomasa, que va a servir de alimento a otros seres vivos. Están en la base de la cadena alimenticia. Esto es más importante, por ejemplo, en ecosistemas marinos.

MECANISMO DE OBTENCIÓN DE ENERGÍA

Las moléculas poseen enlaces químicos cuya energía puede ser utilizada por microorganismos. La manera de usar esta energía, es mediante reacciones de oxidación-reducción (también denominadas REDOX).

Los microorganismos que usan la luz, la transforman en energía química mediante fotosíntesis, por lo que todos los organismos usan energía química.

– **OXIDACIÓN**, consiste en la eliminación de electrones de un átomo o de una sustancia, pero también puede ser la eliminación de átomos de hidrógeno de una sustancia ($H=H^{++}e^{-}$).

– **REDUCCIÓN**, ganancia de un e^{-} o de un átomo de H.

Así, las reacciones redox son la transferencia de electrones o de átomos de hidrógeno desde una sustancia que se oxida a otra sust. que se reduce. La sustancia que se oxida (reducida) es el dador de e^{-} y la que se reduce (oxidado) es el aceptor de electrones.

El dador de electrones va a ceder protones al aceptor de electrones en la célula --> el dador, que está reducido al transferirse los electrones, se oxida y viceversa.

Al dador de electrones también se le denomina **fuerza de energía o fuerza de electrones**.

Hay un concepto: **POTENCIAL REDOX**: nos indica la tendencia o facilidad de un compuesto para ceder e^{-} y oxidarse, o para captar e^{-} y reducirse. Se representa **E01** y es un valor relativo medido en voltios --> representa el número de voltios necesarios para arrancar un electrón de una sustancia. Es relativo, porque se mide con respecto del potencial redox del H gas.

La medida de **E01** negativa, indica que el compuesto tiene una elevada tendencia a ceder electrones y la medida positiva, indica que tiene una elevada tendencia a captar electrones.

La forma oxidada y reducida de una sustancia se denomina **par redox**.

Ejemplo: O₂/H₂O forma oxidada/forma reducida

H⁺/H₂

Cada par redox tiene un valor de potencial redox, y para una serie de sustancias que participan en reacciones metabólicas, se van a colocar en una columna denominada **torre de potencial redox** --> los pares Redox de diferentes sustancias se colocan de menor a mayor potencial redox.

E01=valor negativo

E01=valor positivo

Esta colocación nos va a permitir conocer de donde a donde se desplazan los electrones. La forma reducida de un par redox con un potencial negativo, está en la zona superior, va a ceder electrones a la forma oxidada de otro par redox con un potencial más positivo, situado en la zona inferior de la tabla. Así, en las reacciones redox, los electrones van de arriba a abajo --> EXOTÉRMICAS --> se libera energía, que va a ser usada por la célula y que va a ser tanto mayor cuanto mayor sea la diferencia de potencial redox entre el dador (arriba) y el aceptor (abajo).

DADOR

fuelle de energía

e- Energía biosíntesis, movimiento

transporte

ACEPTOR

En la célula, las reacciones redox transcurren a través de multitud de etapas, para lo que se requieren dos ayudas o componentes:

– **Transportadores de electrones**, son sustancias que actúan como intermediarios entre distintas etapas y que llevan electrones de una sustancia a otra. Estos transportadores, a su vez, pueden ser de diferentes tipos:

– **SOLUBLES**: que están en el citoplasma de la célula. Los dos principales son el **NAD⁺** (nicotinamidaadenin dinucleótido) y el **NADP⁺** (nicotinamidaadenin dinucleótido fosfato). Son más comunes en la forma oxidada (**NAD⁺** y **NADP⁺**).

En realidad, son transportadores de Hidrógeno (H).

NADPH

$\text{NADP}^+ + 2(\text{H}^+ + \text{e}^-) \longrightarrow \text{NADPH} + \text{H}^+$

NADPH₂

NADH

$\text{NAD}^+ + 2(\text{H}^+ + \text{e}^-) \longrightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$

NADH₂

Sólo coge un electrón para neutralizar la carga, y un $H^+ + e^- \rightarrow H$, el otro H^+ queda libre en el medio. Así, los pares redox son:

$NAD^+ / NADH + H^+$ Tienen el mismo E^0

$NADP^+ / NADPH + H^+$ $E^0 = -0,325$

Este potencial le permite tanto tomar electrones y reducirse, como donar electrones y oxidarse $\rightarrow$ por eso es transportador. La diferencia es que $NAD^+ / NADH + H^+$ actúa en el **catabolismo** y $NADP^+ / NADPH + H^+$ en **anabolismo**.

– **UNIDOS A LA MEMBRANA:** con una serie de sustancias incluidas en una membrana y que actúan de manera secuencial, captando y cediendo electrones o átomos de H. Forman lo que se denomina **Cadena transportadora de electrones** o **CADENA RESPIRATORIA (c. t. electrones)**.

– **Compuestos de alta energía**, también son sustancias que actúan de intermediarias, llevando la energía que se libera en las reacciones redox al punto de la célula donde se va a utilizar (biosíntesis, movimiento, transporte...). Normalmente, tienen enlaces fosfato de tipo éster o de tipo anhidro, siendo el compuesto más común el **ATP** (adenin-trifosfato). El ATP es considerado como la moneda energética en todas las reacciones celulares.

$A - P - P - P$

enlaces éster

Los dos últimos enlaces son de una elevada energía, por tanto, al romperse se libera gran cantidad de energía que se usa para realizar un trabajo.

Hay dos procedimientos o formas de sintetizar ATP durante el catabolismo:

– **FOSFORILACIÓN a nivel de sustrato:** transcurre a través de una reacción de una etapa y está catalizado por una enzima.

– **FOSFORILACIÓN OXIDATIVA:** interviene una cadena de transporte de electrones y se lleva a cabo por un procedimiento que se considera **Quimiosmótico**.

Rutas Metabólicas en MICROORGANISMOS

Las rutas metabólicas son los diferentes pasos del metabolismo para obtener energía. Existen diferentes rutas metabólicas:

1.– Basadas en la oxidación de un compuesto orgánico para obtener energía (**METABOLISMO QUIMIOORGANÓTROFO**). Hay diferentes rutas metabólicas, pero en todas ellas hay una sustancia orgánica (fuente de electrones) que se oxida $\rightarrow$ los electrones van a parar a un aceptor de electrones. Según como sea el aceptor de estos electrones puede haber diferentes rutas para la oxidación de compuestos orgánicos:

– Aceptor de electrones **EXÓGENO** (tomado del medio externo) $\rightarrow$ la ruta metabólica es la **respiración**2.

– Aceptor de electrones **ENDÓGENO** (aceptor presente en la célula y generado durante la oxidación de la fuente de energía $\rightarrow$ orgánico). La ruta metabólica es la **fermentación**1.

RESPIRACIÓN: si el aceptor es O₂ es **aerobia2.1**, pero si el aceptor no es el O₂ () la respiración es **anaerobia2.2**.

FERMENTACIÓN1: es una ruta de obtención de energía mediante la oxidación parcial de un compuesto orgánico (fuente de energía). El aceptor de electrones es un compuesto orgánico endógeno, formado durante la oxidación del propio comp. orgánico. Debido a que es una oxidación parcial, se libera poca energía (poco ATP). Además, parte de la energía del sustrato orgánico, permanece todavía en los productos de la fermentación.

Otras características de esta ruta metabólica son las siguientes:

- la fermentación no necesita oxígeno
- el ATP se sintetiza mediante fosforilación a nivel de sustrato
- es una ruta típica de bacterias, aunque también es llevada a cabo por algunas levaduras.
- el compuesto orgánico más frecuentemente oxidado es la **glucosa**, pero hay muchos otros compuestos orgánicos que pueden ser fermentados por bacterias.
- al final del proceso, se forman diferentes productos de fermentación, algunos de los cuales tienen un valor comercial (es el caso del vino, diferentes alcoholes, pan,...)
- tanto el sustrato orgánico como los productos de fermentación, tienen carácter taxonómico --> lo que ayuda a reconocer y clasificar bacterias

La ruta más común de fermentación de glucosa es la conocida **GLUCOLISIS**, que transcurre en 3 grandes etapas:

1. Activación de la molécula de glucosa para poder ser oxidada. Requiere gasto de ATP (todavía no hay reacción de oxidación).
2. Reacciones de oxidación, donde se forma ATP y NAD --> NADH+ + H+
3. Se forman los productos de oxidación, mediante la reducción del aceptor final de electrones.

Glucosa

ATP

ADP

Glucosa 6 fosfato

Fructosa 6 fosfato

ATP

ADP

Fructosa 1,6 difosfato (**1ª FASE**)

dihidroxiacetona fosfato Gliceraldehido-3-fosfato

NAD⁺

Pi

NADH + H⁺

(2) Ac. 1,3 difosfoglicérico

ADP

ATP

(2) Ac. 3 fosfoglicérico

(2) Ac. 2 fosfoglicérico

H₂O

(2) Fosfoenol pirúvico

ADP

ATP

(2) PRÚVICO (2ª FASE)

El balance total de la reacción es el siguiente (en las dos primeras etapas):

Glucosa -----> 2 Pirúvico

2 ADP + 2 Pi -----> 2 ATP (balance energético)

2 NAD⁺ -----> 2 NADH + H⁺

En la célula, hay una cantidad fija y limitada de NAD⁺, por lo que, si continuara la glucólisis de manera indefinida, acabaríamos gastando el NAD⁺ --> necesitamos mecanismos de regeneración de NAD⁺, que es lo que ocurre en la 3ª etapa.

Los electrones del NADH + H van a ir al aceptor de electrones y se formarán los productos de la fermentación.

2 NADH + H ACEPTOR de electrones

(3ª FASE)

2 NAD⁺ Productos de fermentación

Según sea el aceptor final de electrones, habrá diferentes tipos de fermentación:

– **Molécula de pirúvico**, es el caso más sencillo. (**Fermentación Homoláctica**)

láctico deshidrogenasa

Glucosa -----> 2 Pirúvico -----> Ac. láctico

NADH + H⁺ NAD⁺

Realizan esta fermentación, organismos como el Lactobacillus que intervienen en la fabricación de yogures y otros productos lácteos.

– **Fermentación alcohólica**, el pirúvico no actúa como primer aceptor de electrones.

NAD⁺

CO₂ NADH + H⁺

Pirúvico -----> Acetaldehído -----> Etanol

pirúvico alcohol

descarboxilasa deshidrogenasa

En la fermentación del vino, lo que importa realmente es el etanol, pero en la fermentación del pan es el dióxido de carbono lo que realmente interesa. De este tipo de fermentación se encarga el género Sacharomyces.

– **Fermentación ácido–mixta**, es la realizada por la Escherichia coli. Da lugar a ácido surámico, etanol, ácido láctico y ácido acético.

– **Fermentación butanodioica**, realizada por la Enterobacter. Da lugar a butanodiol, etanol, ácido láctico y ácido fórmico.

– **Fermentación acetona–propanol**, realizada por la bacteria Clostridium. Da lugar a acetona, butanol, butírico e isopropanol.

– **Fermentación propiónica**, realizada por Propionobacterium. Da lugar al propanoico, ácido láctico. Es la responsable de la fabricación de los quesos.

Todos estos productos que se obtienen de la fermentación, son considerados como desecho por las bacterias, en cambio, nosotros los usamos para multitud de actividades.

Pero la glucosa no es la única molécula usada para la fermentación, aunque no cabe duda de que es la más usual.

– **Ruta de la FOSFOCITOLASA=FERM. HETEROLÁCTICA**, además de ácido láctico se producen también etanol y dióxido de carbono.

– **Ruta de Etner–Doudoroff**, exclusiva de bacterias.

Glucosa

Glucosa–6–fosfato

Ác. 6 fosfoglicérico

Ác. 2 ceto-3 desoxi-6-fosfogluconico

Gliceraldehído 3 fosfato Pirúvico

RESPIRACIÓN AEROBIA2.1: Características generales:

- se trata de una ruta metabólica de obtención de energía por la oxidación total de un compuesto orgánico (fuente de energía).
- se libera dióxido de carbono
- se forma ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato y mediante fosforilación por cadena transportadora de electrones
- el aceptor final de electrones es el oxígeno
- la cantidad de ATP liberado es elevada (por tratarse de una oxidación total), sobre todo si se compara con la cantidad de ATP obtenida por fermentación.

oxidación**

GLUCOSA -----> CO₂

ATP

** En la oxidación, la glucosa, en el proceso de glucólisis forma dos moléculas de pirúvico con la formación de ATP por fosforilación a nivel de sustrato y 2 NADH + H⁺.

2 ATP

GLUCOSA -----> 2 pirúvico

2 NAD⁺

2 NADH + H⁺

En presencia de oxígeno, el pirúvico es oxidado totalmente a dióxido de carbono --> **CICLO DE KREBS=CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO**. Antes de entrar en este ciclo, el pirúvico pierde un dióxido de carbono y se oxida a acetil-CoA, que es la que se condensa con una molécula de oxalacético para formar ácido cítrico, y tras una serie de reacciones (que forman el ciclo de Krebs) se vuelve a regenerar el oxalacético y los compuestos que estaban en la coenzima A (CoA) se liberan en forma de dióxido de carbono.

2CO₂

2 pirúvico -----> 2 acetil-CoA

2NAD⁺

2NADH + H⁺

OXALACÉTICO ciclo de krebs ÁCIDO CÍTRICO

CO₂

Del ciclo de Krebs es importante saber lo siguiente:

- por cada acetil-CoA se producen 2CO₂
- los e⁻ y H⁺ del acetil-CoA van a reducir el 3 NAD⁺ -----> 3 NADH + H⁺ y el FAD -----> FADH₂
- por fosforilación a nivel de sustrato, se produce una molécula de **GTP** que formará ATP.

Al final de la respiración aerobia, tenemos que la glucosa se ha oxidado completamente en seis moléculas de dióxido de carbono:

Glucosa -----> 6 CO₂

10 NAD⁺ -----> 10 NADH + H⁺

2 FAD⁺ -----> 2 FADH₂

4 ADP + Pi -----> 4 ATP** (fosforilación a nivel de sustrato)

** 2 por glucólisis y otros 2 procedentes del ciclo de krebs

Las moléculas FADH₂ y NADH₂ son transportadoras de electrones reducidos, y van a ceder sus electrones a una cadena transportadora de electrones --> es ahí donde tiene lugar la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa, y al final los electrones van a parar al oxígeno para formar H₂O.

CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES: son moléculas que están siempre en una membrana (que les hace de soporte). En **procariotas** es la **membrana plasmática**, y en **eucariotas** la **membrana interna de las mitocondrias**.

Las moléculas que forman la cadena transportadora de electrones son transportadoras de electrones (ceden electrones y los captan de nuevo). Entre las mol. transportadoras hay:

- **PROTEÍNAS:** – NAD⁺ deshidrogenasa
- flavoproteínas
- citocromos
- proteínas en azufre
- **QUINONAS:** son bastante más liposolubles

Estos transportadores pueden transportar electrones únicamente o H⁺ y electrones. La función de la cadena transportadora de electrones es doble:

- Regeneración de NAD⁺
- Síntesis de ATP

Las moléculas que forman la cadena, se ordenan en orden a sus potenciales redox, de más negativo a más positivo --> tiene lugar en ella el transporte de electrones en reacciones de oxidorreducción. El ATP se forma por fosforilación oxidativa (procesos quimiosmóticos).

membrana plasmática

electrones

H⁺

NADH + H⁺

NAD⁺

H⁺

O₂

H₂O

ADP + P_i

H⁺

ATP

Los electrones que se introducen en la cadena, son de NADH + H⁺ y también los H⁺. Los electrones son transportados por los transportadores hasta el aceptor final, O₂, para formar agua. En esta cadena de electrones hay momentos en que se bombean hidrógenos (H⁺) al exterior de la célula.

Cuando el oxígeno recibe los electrones, éstos se combinan con los H⁺ para formar agua. Estos H⁺ provienen de la disociación de moléculas de agua que estarán en el citoplasma. Así, hay un gran incremento de grupos OH⁻ y una baja [H⁺].

H₂O H⁺ + 1/2 O₂

electrones

alta [OH⁻] H₂O

baja [H⁺]

Este hecho tiene como consecuencia que a través de la membrana se produzca un gradiente de pH ácido en el exterior, y alcalino en el interior. Todo esto provoca que la membrana, por el lado interno, sea menor y en el exterior sea más gruesa. Se provoca un gradiente de potencial de eléctrico a través de la membrana.

La existencia de un gradiente de pH y potencial eléctrico, tiene como consecuencia que en la membrana se produce una fuerza --> llamada **fuerza motriz de protones**. La membrana tiene almacenada gran cantidad de electrones que pueden ser usados para realizar un trabajo en cualquier instante que se necesite: puede ser para síntesis de ATP o para transporte activo a través de la propia membrana.

La síntesis de ATP se produce de la siguiente forma: la fuerza motriz se usa para crear ATP --> la enzima

ATP-sintetasa (integral de membrana) tiene en su interior un canal que permite la entrada de H^+ de regreso al citoplasma. Cuando los H^+ entran en el citoplasma, se disipa la fuerza protón-motriz y la energía es usada para sintetizar ATP a partir de $ADP + P_i$.

Por cada $NADH + H^+$ que se reoxida a NAD^+ se forman 3 moléculas de ATP.

NADH + H

3 ATP (en el mejor de los casos)

NAD

Balance energético de la respiración:

Glucosa -----> 2 pirúvico + 2 ATP + 2NADH₂

CO₂

2 pirúvico -----> 2 Acetil-CoA + 2 NADH₂

ciclo de Krebs

2 Acetil-CoA -----> 4 CO₂ + 2 ATP + 6 NADH₂ + 2 FADH

4 ATP + 10 NADH₂ + 2 FADH

30 ATP 4 ATP

38 ATP's

Así, es mucho más eficaz que la fermentación:

resp. aerobia

Glucosa -----> CO₂ **38 ATP**

Glucosa -----> ETANOL + CO₂ **2 ATP**

fermentación

Todo esto lo había observado Pasteur cuando estudiaba como mejorar la producción de etanol en la fermentación del vino (provocada por Sacharomyces cerevisiae) --> se conoce como **efecto Pasteur**. Pasteur pensó que al aumentar la cantidad de oxígeno, se produciría una mayor cantidad de etanol, pero pasó todo lo contrario, ya que obtuvo dióxido de carbono (sin etanol) y además, Sacharomyces cerevisiae crecía muchísimo (aumentaba su biomasa). Esto se debió a que había provocado un cambio en el metabolismo --> había pasado de metabolismo fermentativo (producción de etanol y poco ATP) a un metabolismo respiratorio mucho más eficaz (producción de mucho ATP) que hacía que las células crecieran mucho más rápido. (Cabe destacar que Pasteur pudo estudiar este hecho porque el microorganismo en cuestión es de fermentación facultativa, puede hacer las dos cosas, dependiendo de la presencia de oxígeno o no).

RESPIRACIÓN ANAEROBIA 2.2: ruta metabólica de obtención de energía por la oxidación de un compuesto orgánico (dador de electrones=fuente de energía), en la que el aceptor final de electrones **no** es el

oxígeno. Este aceptor es un compuesto oxidado, que puede ser una sustancia inorgánica o un comp. orgánico. Es exclusiva de procariotas.

Ocurre de la siguiente manera:

oxidación total

comp. orgánicos -----> **CO₂**

e⁻; H⁺

NAD⁺ NADH + H⁺

actúa como ttador de e⁻

e⁻

ATP <----- cadena transportadora de electrones

fosfor. e⁻

oxidativa aceptor aceptor

oxidado reducido

Existen diferentes aceptores de electrones que van a ser usados por distintas bacterias:

Eo -0,3 CH₃-COO (accept. red.) respiración con carbono, bacterias

CO₂ (accept. oxidado) homoacetogénicas

-0,27 HS⁻ respiración con azufre

S₀

-0,25 CH₄ respiración con carbono, arqueas

CO₂ metanogénicas

HS⁻ respiración con sulfatos, sulfato

SO₄²⁻ reductasas

0 Succinato respiración con fumarato

Fumarato

+0,4 NO₂⁻, N₂ respiración con nitrato,

NO₃⁻ desnitrificación

+0,75 Fe²⁺ respiración con hierro

Fe³⁺

+0,82 H₂O respiración aerobia

O₂

Los electrones van a ir desde el NADH al aceptor, donde se libera energía que será tanto mayor cuanto mayor sea la diferencia de potencial entre el NADH y el aceptor. Por ese motivo, si se usan nitratos, se libera más energía que con SO₄²⁻.

E_o -0,32 NAD + H⁺ E' < E

energía energía' -0,25

+0,4 NO₃⁻ SO₄²⁻

Esto se debe a que la constante es mayor en unas células que en otras. Además, se ve que la respiración aerobia desprende más energía que cualquier otra ruta metabólica.

Existen diferentes tipos de bacterias:

– **BACTERIAS ANAEROBIAS ESTRUCTURADAS:** el **aceptor de electrones** es obligatoriamente **distinto del oxígeno**. La presencia de oxígeno mata a esta clase de bacterias, por lo que viven en ambientes completamente anóxicos (sin O₂). Ejemplo: bacterias reductoras cuyo aceptor es el SO₄²⁻.

– **BACTERIAS ANAEROBIAS FACULTATIVAS:** si hay oxígeno realizan la respiración aerobia, pero en ausencia de este usan NO₃⁻ (resp. anaerobia). Pueden vivir perfectamente en ambientes óxicos y anóxicos.

Antes de acabar con la respiración anaerobia es importante aclarar dos conceptos:

– **DESULFURACIÓN / DENITRIFICACIÓN:** muchas plantas y microorganismos utilizan directamente como fuente de S y N, para crecer, SO₄²⁻ y NO₃⁻; ya que son capaces de reducir a nivel sustrato compuestos orgánicos que entran en la célula --> la llamada **reducción asimilativa**.

Pero bacterias anaerobias (resp. anaerobia) van a reducir los SO₄²⁻----->SH₂ y NO₃⁻----->NO₂⁻-----> N₂ gas. Tanto SH₂ como N₂ son más volátiles, por tanto, escapan del hábitat de la respiración anaerobia y pueden llegar a la atmósfera, por lo que el ambiente donde viven las bacterias se empobrece con NO₃⁻ y SO₄²⁻, que ya no pueden ser ingeridos por las plantas --> es un importante problema para algunos ambientes, como los terrenos que cultivo --> es la llamada **reducción desasimilativa**.

2.– **METABOLISMO QUIMIOLITÓTROFO.** Proceso de obtención de energía mediante la oxidación de un compuesto químico inorgánico que está reducido y que las bacterias no van a tomar del ambiente. Es exclusivo de procariotas, principalmente de microorganismos del reino Bacterias, aunque cada vez se conocen más archaeas que también lo hacen. En esta ruta, el dador de electrones (compuesto inorgánico) reducido puede ser:

– H₂ -----> se oxida a H₂O. **bacterias del hidrógeno**

– SH₂, S₀, S₂O₃²⁻ -----> oxidado a SO₄²⁻. **bacterias del azufre=bacterias no coloreadas del azufre (sin clorofila)**

– NH₃ o NH₄²⁺ dependiendo del pH -----> NO₃⁻ **bacterias nitrificantes,**

– NO_3^- -----> NO_2^- **aunque una reduce sólo**

una cosa, viven juntas

– Fe^{2+} -----> Fe^{3+} . **bacterias del hierro**

El aceptor final de electrones puede ser:

– O_2 , la mayoría de las veces. **BACT. QUIMIOLITÓTROFAS AEROBIAS**

– compuesto diferente de O_2 --> NO_3^- . **BACT. QUIMIOLITO. ANAEROBIAS**

Estas bacterias litótrofas, son también (en la mayoría de los casos) autótrofas --> LITOAUTÓTROFAS: son capaces de realizar la fijación del dióxido de carbono. Son capaces de usar la energía de la oxidación de un compuesto químico inorgánico, para reducir el CO_2 a compuesto orgánico. (antes se pensaba que sólo lo hacían las plantas).

oxidación

comp. químico inorg. reducido -----> c. q. ing. oxidado

ATP

CO_2 -----> $(\text{CH}_2\text{O})_n$

reducción comp. orgánico

Esta fijación del dióxido de carbono (que se reduce a un compuesto orgánico por la acción de ATP) se produce a través de una serie de reacciones químicas --> es el denominado **CICLO DE CALVIN-BENSON**. Para esta reducción, necesitamos un compuesto reductor que dé los electrones y los H^+ --> $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (reacción de biosíntesis).

– **Síntesis de ATP:** se produce por fosforilación oxidativa, en la que participa una cadena transportadora de electrones. Es un mecanismo quimiosmótico --> durante el transporte de electrones, se genera una diferencia de potencial a través de la membrana y un gradiente de pH. Esto provoca que la membrana tenga un estado energético (**fuerza protón motriz**), que va a crear ATP por acción de la ATP-sintetasa.

ATP-sintetasa

$\text{ADP} + \text{Pi}$ -----> ATP

oxidación

CQI reducido -----> CQI oxidado

electrones

$\text{NADP}^+ + \text{NADPH} + \text{H}^+$

electrones

$\text{ADP} + \text{Pi}$

ATP e membrana

O₂

aerobias

H₂O

NO₃⁻

anaerobias

NO₂⁻

– **Síntesis de NADPH + H⁺**: se forma por reducción del NADP⁺ en la que el dador de electrones es normalmente el mismo compuesto químico inorgánico, que es utilizado también como fuente de energía --> tomado del ambiente reducido.

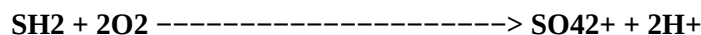
También pueden usar como dadores de electrones: H₂, SH₂, NH₃, SO₂⁻.

Hay diferentes formas de que los electrones lleguen al aceptor (NADP⁺), dependiendo de quien sea el dador. El NADP⁺ tiene un potencial Eo'=-0,32, por lo que si el dador tiene un potencial redox **más negativo**, el paso de electrones va a ser directo. Sólo se necesita una enzima que catalice la reacción, la hidrogenasa.

En cambio, si el dador tiene un potencial redox **más positivo** que el NADP⁺ (ejemplo: H₂S, Eo'=-0,22v). Hay que enviar electrones de una sustancia a otra de contracorriente --> hay que usar energía, se produce un flujo inverso de electrones mediante un proceso en el que también participa una constante, pero ahora funciona en sentido contrario.

Ejemplo de bacteria quimiolitótrofa: Thiobacillus ferrooxidans, que pertenece al grupo de bacterias no coloreadas del azufre. Obtiene energía por la oxidación de compuestos de azufre, tales como SH₂, S₀, S₂O₃²⁻, Fe²⁺. Es generalmente aerobia, por lo que usa el oxígeno como aceptor de electrones en la oxidación.

Si usa:



ATP

esta bacteria, cuando crece, va a provocar acidificación del medio (puede llegar a pH=1 y seguir viviendo en ese medio --> es una bacteria acidófila).

Para sintetizar ATP usa una cte:

O₂

FP (flavoprot.) --> Q (quinona) --> cit b --> cit c --> citaa₃ -->

H₂O

-----> siempre así para la síntesis de ATP ----->

Cuando usa SH₂, éste cede electrones a nivel de la FP. Si la fuente de energía fuera S₀, S₂O₃²⁻, los electrones entrarían a nivel del citocromo c.

Para reducir NADP⁺ → NADPH + H⁺. Los electrones vienen de la cadena transportadora de electrones, al FP (también del SH₂ o del cit c a contracorriente). Se usa directamente la fuerza protón motriz de la membrana.

Así, tiene un metabolismo poco rentable. De la oxidación del H₂S se obtiene muy poca energía (aunque se obtiene más que con otros compuestos). Además, parte de la energía debe usarse para obtener poder reductor, para la fijación de dióxido de carbono. No obstante, no desaparece porque oxida muchas cantidades de sustrato (aunque crece poco).

Esta bacteria es capaz de vivir en ambientes donde no crecen otros seres vivos: pH=1, sin materia orgánica y sin luz, sólo necesita H₂S. Crece muy bien en el fondo del mar a mucha profundidad, sin luz, ni mat. orgánica, usando sólo H₂S que se libera en las fuentes termales de origen volcánico.

3.- **METABOLISMO FOTOTROFO.** Consiste en rutas metabólicas de obtención de energía a partir de energía luminosa.

Se transforma **E luminosa** → **E química (en forma de ATP)**

Este proceso se lleva a cabo mediante la **FOTOFOSFORILACIÓN**. La mayoría de los organismos que realizan este metabolismo son autótrofos, por lo que usan la energía de la luz para reducir el CO₂ a compuestos orgánicos (fijando CO₂) → son organismos fotoautótrofos (**FOTOSÍNTESIS**).

La fotosíntesis se puede separar en dos grupos de reacciones bien diferenciadas:

- **R. lumínicas**, dependen de la luz y en ellas se transforma la E lumínica en ATP.
- **R. oscuras**, puede ocurrir en ausencia de luz solar. Es cuando tiene lugar la fijación o reducción de CO₂, que ocurre con gasto de ATP de las reacciones lumínicas.

NADPH + H⁺ CO₂

reacciones → **ATP** → **reacciones**

lumínicas oscuras (COH)_n

Para la reducción del CO₂ es necesario también un compuesto reductor, que será aportado por el NADPH + H⁺, que se forma por NADP⁺ que se ha reducido. El dador de electrones que provoca la reducción de NADP⁺ → NADPH es el agua, que da electrones por medio de un proceso conocido como **FOTOLISIS**, que requiere la energía de la luz y en la que se libera O₂. Se llama por tanto, **fotosíntesis oxigénica** y la realizan las plantas, algas y cianobacterias.

Otro dador de electrones puede ser SH₂, S₀, S₂O₃²⁻, H₂, que son compuestos orgánicos → no se libera O₂ por lo que se denomina **fotosíntesis anoxigénica**, y es realizada por bacterias verdes y rojas.

FOTOSÍNTESIS ANOXIGÉNICA: El primer aceptor de electrones es la bacterioferritina, que no es más que una bacterioclorofila a la que le falta el átomo de Mg.

La BF cede el electrón a una cadena de transporte de electrones con quinonas, complejo citocromo b₁ (citocromos), hasta que al final, vuelve a la bacterioclorofila de donde había partido. Por ello el proceso es

cíclico.

Durante el transporte de electrones se genera una fuerza protón motriz, a través de la membrana fotosintética y la energía de esta fuerza se usa para formar ATP (flujo de electrones cíclico).

Reducción de NADP⁺, la formación de NADPH depende de la molécula dadora de electrones. El dador es siempre H₂, SH₂, u otros compuestos orgánicos.

Si el dador tiene un potencial redox más negativo que el NADP⁺ el método es directo.

HIDROGENASA

H₂ -----> NADP⁺

(-0,12v) electrones (0,32v)

Si el dador de electrones tiene un potencial redox menos negativo que el NADP⁺, la cesión de electrones se realiza por medio de un flujo inverso de electrones, que requiere un aporte/suministro de energía. Es el caso de SH₂, y compuestos croánicos (en estos casos, los electrones son llevados por mecanismos en contra del gradiente electroquímico).

FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA: Realizada por plantas, algas y cianobacterias. En ella, se obtiene energía a través de la luz, por la acción de dos fotosistemas que gastan dos fotones. El dador de electrones es el agua, que es el encargado de ceder los electrones necesarios para convertir el NADP⁺ --> NADPH. Este proceso genera ATP por fosforilación acíclica.

dos fotones

electrones

NADP⁺

H₂O ----->

NADPH + H⁺

ATP

El agua se hidroliza por fotólisis, liberando O₂ como producto de desecho. El flujo de electrones sigue un esquema que tiene la forma de z invertida, por ello, al flujo de electrones se le denomina **z**.

Hemos dicho que participan dos fotosistemas:

– **FOTOSISTEMA II (FSII):** clorofila con un máximo de absorción de 620nm.

Por ello se le denomina **FS620**.

– **FOTOSISTEMA I (FSI):** clorofila con un máximo de 700nm.

Se llama **FS700**.

En primer lugar actúa el FSII, con un potencial redox muy positivo (E_o>1). Este FSII, es capaz de captar

electrones del O₂ cuando la clorofila es excitada por un fotón. Tiene lugar entonces, la fotólisis del agua. Esta molécula de clorofila, se transforma en un potente reductor ($E_0 = -0,2$) y cederá el primer electrón a la feoptina (clorofila A sin Mg) y ésta a su vez, lo cederá a una cadena de transporte de electrones en la que participan: plastoquinona, citb, citf que es la plastocianina (proteína más clorofila). De esta forma, los electrones van a la clorofila del FSI.

Esta clorofila había tomado un fotón y se había convertido en un potente reductor, con E_0 negativo, por lo tanto no hace falta que ceda el electrón a un aceptor, es por tanto, una **clorofila modificada**.

La clorofila cede los electrones a la Ferredoxina (S y Fe) que cederá, más tarde, los electrones al NADP para poder formar NADPH + H⁺.

Durante el transporte de electrones, se forma ATP por fotofosforilación no cíclica (acíclica).

Anabolismo

Es la biosíntesis de componentes celulares. Está formado por diferentes rutas anabólicas que requieren energía (almacenada en forma de ATP por el catabolismo). Entre los componentes de las células, se encuentra mayoritariamente el agua, monómeros como los aa que forman proteínas, azúcares que darán lugar a polisacáridos, nucleótidos que darán lugar al ácido nucleico.

En el catabolismo, además, se formaban moléculas sencillas que sirven de base de síntesis de componentes celulares. Estas moléculas sencillas se llaman **compuestos intermediarios clave** y son 12: Glucosa-1-P, Glucosa-5-P, Ribosa-5-P, Entrosa-5-P, PEP, Piruvico, 3-PGlicérico, α-cetoglutarato, succinil-Co-A, oxalacético, DHAP, Acetil-Co-A.

Estos componentes pueden venir de organismos heterótrofos o de la fijación de dióxido de carbono, y van a dar monómeros (por polimerización va a dar macromoléculas, diferentes polímeros → elementos estructurales o funcionales (enzimas)).

aa -----> proteínas -----> **enzimas, ribosomas y membrana**

carbohidratos -----> polisacáridos -----> **pared celular**

ácidos grasos -----> lípidos -----> **membrana**

nucleótidos -----> ADN (cromosomas), ARN -----> **ribosomas**

BIOSÍNTESIS DE MACROMOLÉCULAS

Vamos a ver la síntesis general de:

– ADN, ARN y proteínas.

– pared celular de bacterias (en concreto del peptidoglicano).

SÍNTESIS DE ADN=REPLICACIÓN, es la polimerización de desoxirribonucleótidos que forman el ADN.

SÍNTESIS DE ARN=TRANSCRIPCIÓN, polimerización de ribonucleótidos que forman ARN.

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS=TRADUCCIÓN, polimerización de aa para dar las proteínas.

Tanto el ADN como el ARN se les llama **moléculas informacionales** --> contienen información para las actividades de la célula.

Las proteínas se denominan **EFFECTORAS** cuando actúan como enzimas que llevan a cabo las actividades celulares, además son estructurales porque forman parte de estructuras de la célula. Así, la información va desde ADN --> proteínas. El ARN actúa como molécula intermediaria de paso de información de ADN a las proteínas => **Dogma central de la biología molecular**. Sirve para todos los organismos, menos para los retrovirus --> no pueden usar ADN, usan moléculas de ARN para sintetizar proteínas.

El objetivo de **REPLICACIÓN=Síntesis de ADN** es asegurar que la información contenida en la molécula de ADN se mantenga intacta a través de diferentes generaciones celulares y que finalmente esta información es expresada en las proteínas.

En bacterias se presenta como cromosoma bacteriano y también puede formar los plásmidos.

En cualquier caso, el ADN es una molécula formada por dos cadenas de polinucleótidos que en el caso de bacterias forma un círculo cerrado, y tiene estructura helicoidal. Las cadenas de polinucleótidos están formadas por la agrupación de desoxirribonucleótidos, cada uno de los cuales tiene una molécula de desoxirribosa unida a una base nitrogenada. Las moléculas de polinucleótidos se unen entre si por enlaces fosfodiester.

Hay 4 bases púricas:

- Adenina y Guanina --> **púricas**
- Timina y Citosina --> **pirimidínicas**

Las cadenas de polinucleótidos son complementarias: donde hay una T hay una A (Idem con C y con G). Esta estructura va a permitir almacenar la información genética, ordenada en la secuencia de bases nitrogenadas. Además, el hecho de que las dos cadenas sean complementarias, va a hacer que durante la replicación cada cadena sirve de molde para las síntesis de la cadena complementaria --> va a permitir mantener la información genética a la descendencia.

La replicación comienza en un punto llamado **origen de replicación**, en el que se separan las dos cadenas de ADN por la acción de un enzima llamada **Helicasa**. A continuación, hay otro enzima que es la ADN polimerasa, que cataboliza la polimerización de los nucleótidos tomando como molde una de las cadenas de ADN, que son complementarias a las que ya había.

El proceso continúa en ambas direcciones, y se forman dos moléculas de ADN: una cadena antigua y otra de nueva síntesis --> **SEMICONSERVACIÓN**.

La **TRANSCRIPCIÓN** consiste en la síntesis de ARN, tomando como base una cadena de ADN. Existen tres tipos diferentes de ARN en la célula:

- ARNm, contiene información para la síntesis de una cadena polipeptídica.
- ARNr, forma parte de los ribosomas, que es la estructura donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas.
- ARNt, lleva los aa activados al lugar de la síntesis de proteínas.

El ARN es un polinucleótido con ribosa más bases nitrogenadas, que pueden ser A, U, G, C. Es monocatenario, a excepción de algún virus. En la transcripción actúa la ARN-polimerasa, que es la que

cataboliza la polimerización de nucleótidos, usando de molde una cadena de ADN. La ARN-polimerasa se une al ADN en una región que se llama **PROMOTOR**, que precede a un gen. La cadena que se transcribe en ese proceso es aquella en que tiene delante un promotor.

En la **TRADUCCIÓN** participan:

- ARNm, determina la secuencia de aa en la proteína. Esta secuencia está determinada para que a 3 bases del ARN (CODON) le corresponda un aa determinado en la proteína.
- Ribosomas, estructuras con ARN y proteínas, que son los que catalizan la unión entre aminoácidos.
- ARNt, lleva el aa al ribosoma.
- Factores proteicos.
- Aporte de energía en forma de GTP.

BIOSÍNTESIS DE PEPTIDOGLICANO, macromolécula que forma parte de la pared celular de bacterias. Es típicamente bacteriano.

Casi todas las bacterias poseen pared celular, que es una estructura rígida que proporciona o da la forma a la célula, limita y separa la célula del medio externo. Hay dos clases de pared celular, dependiendo de como la bacteria reacciona frente a la **tinción de Gram**.

- Gram + --> las bacterias tienen alrededor una capa gruesa de polisacáridos (peptidoglicano).
- Gram - --> capa fina de peptidoglicano y por fuera hay otra de lipopolisacáridos (unidad de membrana --> membrana externa).

El peptidoglicano tiene una estructura 3D en forma de saco, formado por cadenas de un polisacárido en los cuales alternan moléculas de NAG (N-acetilglucosamina, G) y NAM (N-acetilmurámico, M). Estas dos moléculas se unen entre sí por enlace glucosídico.

A veces, a las moléculas de NAM se les une un péptido con 4 aa (tetrapéptido): L-ala - D-glu -DAP (diaminopimélico) y D-ala. En Gram + cambia la DAP por L-Lys.

G - M - G - M - G - M - G - M

L - ala

enlace glucosídico

D - glu

DAP

D - ala

En una molécula de peptidoglicano hay más moléculas de polisacáridos unidas entre sí, por puentes peptídicos que se producen entre péptidos de diferentes cadenas.

..... G - M - G - M - G - M - G

..... M – G – M – G – M – G – M

Se unen en Gram – el grupo amino del DAP de una cadena y el grupo carboxilo de la D–ala de otra cadena (por eso se llama puente peptídico, porque une dos péptidos).

En *Stafilococcus aureus* el puente se establece a través de otro péptido y una pentaglicina (5 Gli). En este caso, el puente se forma entre el grupo amino de D–Ala y el grupo carboxilo de la 1ª Gli y, por el otro lado, el último grupo amino de Gli con el grupo carboxilo de la D–alanina.

Las etapas de la biosíntesis son:

iNterior: 1. Síntesis de los azúcares precursores a partir de glucosa.

2. Activación de los azúcares.

3. Unión de los aa a la molécula NAM.

4. Unión de una molécula transportadora: **bactoprenol**.

5. Unión de NAG.

6. Transporte a través de la membrana.

eXterior: 7. Formación de cadena de polisacáridos.

8. Formación de los puentes peptídicos.

1.– Glucosa va a dar azúcares. Se transforma en:

Glucosa -----> NAG -----> NAM

Va a haber polimerización, pero antes hay una 2.– activación de azúcares por la unión de NAG y un nucleótido (UTP).

NAG UDP–NAG NAM UDP–NAM

UTP Pi UTP Pi

Esta es la forma de obtener la energía necesaria para la unión de G–M --> se rompe el enlace UDP–NAM y con esa energía se forma el enlace glucósido.

3.– Una vez que tenemos el UDP–NAM ,se le van añadiendo 5 aa. Uno a uno con reacciones que necesitan enzimas y ATP. Así, se unen --> L–ala – D–glu – L–Lys – D–ala – D–ala y la molécula se llama **UDP–NAM–pentapéptido**.

4.– Se une a la molécula de Bactoprenol --> molécula llamada bactoprenol–P–P–NAM–pentapéptido, liberándose un UMP.

5.– A continuación, se une NAG --> se forma el enlace glucosido y se vuelve a liberar UMP.

6.– Cuando el disacárido pentanopéptido está unido al bactoprenol, éste gira y saca el disacárido pentapéptido al exterior.

Se rompe el enlace y el bactoprenol se queda con dos grupos fosfato --> libera uno que vuelve a bactoprenol-P listo para volver a unirse.

El disac. pentapéptido se va a unir a una cadena de peptidoglicano que se está alargando --> se alarga en una unidad.

7.- Formación de puentes peptídicos entre cadenas de peptidoglicano --> Gram -.

M - G - M - G - M

G - M - G - M - G

-- M --

L-ala

D-Glu

DAP D-ala

D-ala D-ala

D-ala DAP

D-Glu

L-ala

-- M --

El enlace se forma entre el grupo amino del DAP de una cadena, y el grupo carboxilo de la D-ala subterminal de otra cadena (DAP --> dos grupos amino libres).

La catálisis de este enlace es la transpeptidasa: se va a formar un enlace en el exterior del citoplasma, donde no hay energía en forma de ATP --> la energía proviene de la hidrólisis del enlace peptídico que hay entre las dos D-ala terminales de un péptido.

Al eliminar la D-ala terminal, los péptidos se quedan 4 aminoácidos --> al acabar la síntesis, todos los péptidos se quedan con 4 aminoácidos, los que no intervienen en la síntesis, eliminan las ala en los péptidos que no intervengan.

Antibióticos (ANTIMICROBIANOS) que inhiben la biosíntesis de

macromoléculas en bacterias

sÍNTESIS	aNTIBIÓTICO
1.- Pared celular	1.- Penicilina (beta lactaminosa)
	Cicloserina
	Cefalosporina

	Vancomicina
	Bacitracina
2.- ADN	2.- NOVOBIOCITINA
	Quinonas (ác. nalidixico, no es antibiótico)
3.- ARN	3.- Rifamicina
4.- Proteínas	4.-
50S	Eritromicina y cloranfemicol
30S	Streptomicina y tetraciclina
ARNt	Puromicina
5.- Membrana plasmática	5.- Polimixinas
6.- Ácido fólico	6.- Sulfonamidas

Estas sustancias inhiben la biosíntesis de células procariotas como bacterias, pero que no infectan a la biosíntesis en células eucariotas (como células animales) por eso, se usan como compuestos antimicrobianos (muchos son antibióticos) en el tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por microorganismos.

Todo esto se debe a que tienen **toxicidad selectiva** --> **sustancias quimioterapéuticas**, es decir, compuestos químicos usados como terapia en enfermedades. Estas sustancias pueden ser:

- **Antibióticos**, son productos naturales (producidos por microorganismos) y que además inhiben el crecimiento de otros microorganismos.
- **Compuestos de síntesis**, son más o menos iguales, pero no se producen por microorganismos. Son productos sintéticos formados durante una reacción química.

Los **antimicrobianos**:

- son inhibidores de biosíntesis de bacterias.
- tienen toxicidad selectiva debido a que enzimas o elementos que participan en la biosíntesis son diferentes en bacterias que en células eucariotas.

CONTROL DE METABOLISMO

En una célula no todas las reacciones ocurren al mismo tiempo, sino que hay un control (regulación) de las reacciones químicas. Se efectúa sobre las energías que catalizan las reacciones metabólicas.

Este control se puede hacer de dos maneras: controlando las acciones de enzimas o la síntesis de las propias enzimas.

– **control de la actividad**: un caso muy extendido es la **retroinhibición**, que ocurre sobre todo en las rutas de biosíntesis. Lo que ocurre es que el producto final de una ruta metabólica inhibe la activación del 1er enzima de la ruta (se bloquea).

– **control de la biosíntesis de enzima**: hay que separar dos grupos de enzimas:

– enzimas constitutivas, están siempre presentes en la célula (se sintetizan siempre). Se necesitan siempre porque catalizan sobre todo reacciones de obtención de energía o de obtención de carbono.

Ejemplo: Las enzimas de la glucólisis, del ciclo de Krebs...

– enzimas adaptativas, sólo se sintetizan cuando son necesarias. Hay a su vez dos tipos:

* **enzimas represibles**: son enzimas que catalizan la biosíntesis de un compuesto que puede ser, biosíntesis de aa, purinas, pirimidinas... Sólo se sintetizan las enzimas si el producto está ausente en el medio de cultivo.

Ejemplo: las enzimas que catalizan la síntesis de arginina (Arg) sólo se sintetizan si no hay Arg en el medio
--> La Arg reprime la biosíntesis de las enzimas que participan en su formación.

importante **la represión (**de todas las enzimas**) se realiza a nivel de la transcripción, es decir, se evita que se formen los ARNm que codifican para los enzimas que catalizan la biosíntesis de Arg. La información de la transcripción es específica.

* **enzimas inducibles**: normalmente catalizan el uso de un compuesto como fuente de enzimas o/y como fuente de carbono. Sólo se sintetizan en presencia del sustrato, es decir, si ese compuesto está presente.

La regulación de la síntesis de enzimas:

– **REPRESIBLES**: se lleva a cabo mediante **represión**.

– **INDUCIBLES**: se lleva a cabo mediante **inducción**.

En ambos casos participa una proteína denominada **REPRESOR**, esta proteína interacciona con una sustancia llamada **EFECTOR**. En el caso de la represión, el efector=**correpresor**. En el caso de la inducción, el efector=**INDUCTOR**.

1) Represión. Vamos a ver el ejemplo de represión a enzimas que participan en la biosíntesis de Arg.

Si tenemos un segmento del ADN de la bacteria, con sus genes que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis de Arg=genes estructurales. Anterior a estos genes en el ADN, hay un fragmento llamado **operador**, anterior a éste hay otro segmento llamado **promotor** --> a él se une la ARN-polimerasa que cataliza la biosíntesis del ARNm.

También está por ahí el represor, inactivo normalmente --> no se une al ADN, por lo que deja vía libre a la ADN-polimerasa. Esto es lo que ocurre en ausencia de Arg.

Cuando hay Arg en el medio, es cuando tiene realmente lugar la represión. El represor se une al correpresor y se hace activo, se une al operador y bloquea la transcripción de los genes estructurales. Así, la Arg o un derivado actúan como correpresor --> va a impedir la transcripción de los genes que codifican para los enzimas de la síntesis de Arg.

El **operón** es un conjunto de genes que están bajo el control del mismo operador. En el ejemplo, el operón está formado por el operador más genes estructurales y sería el operador de la Arg.

2) Inducción. Es a nivel también de la transcripción y normalmente tiene lugar para enzimas que catalizan la utilización de un producto. Se sintetizan en presencia de un sustrato.

Tenemos un represor que normalmente está activo y, por lo tanto, se une al operador e inhibe la transcripción.

El efector (en este caso inductor) se une al represor y lo inactiva.

Ejemplo: utilización de lactosa que es hidrolizado por la enzima beta-Galactosidasa -----> Glucosa + Galactosa. La enzima sólo es sintetizada en presencia de lactosa.

En ausencia de lactosa. Tenemos una secuencia de ADN con fragmentos=genes estructurales, para la utilización de lactosa. Uno de estos genes es el que codifica para la beta-galactosidasa, otro para la lactosa permeasa (captador de lactosa).

En presencia de lactosa, ésta ejerce un control mayor. La lactosa o un derivado actúa como inductor y se une al represor: el represor es inactivo (ya no se une al O) y la ARN polimerasa tiene vía libre para llevar a cabo la transcripción de los genes estructurales.

lactosa: 1º que se descubrió. Explica como es la región de la expresión de genes en las bacterias. Descubierta por Jacob y Monod en los 50 --> premio NOBEL.

La represión por medio de operones es exclusivo de procesos celulares eucarióticas, donde actúan un mayor número de fenómenos y sustancias.

IECCIÓN 8: Fundamentos de Genética MICROBIANA

CONCEPTOS IMPORTANTES

GENÉTICA, ciencia de la herencia. Estudia, por un lado el material hereditario, y por otro, los mecanismos de transmisión de caracteres de padres a hijos o a través de sucesivas generaciones. Estudia también los mecanismos de expresión de los caracteres (del material hereditario) durante el desarrollo de los organismos. Hay dos aspectos importantes a considerar:

- **Estabilidad** en la transmisión de caracteres a través de diversas generaciones (hijos más o menos iguales a padres).

- **Variabilidad genética**, que permite la evolución de las especies. Podemos definir **evolución**, como la consecuencia de la acumulación de cambios en el material genético de una población.

El **material genético** es el **ADN**, que debe permitir tanto la estabilidad como la variabilidad:

- la estabilidad se consigue en el proceso de replicación.

- la variabilidad se consigue como consecuencia de las mutaciones.

MUTACIÓN, cambios en el material genético, son permanentes y se transmiten a la descendencia.

UNIDAD HEREDITARIA, es el **GEN**, que es un fragmento de ADN que codifica una proteína. Como resultado de la expresión de un gen, obtenemos una proteína. Así, el ADN tiene información a través de la secuencia de bases. Esta información, va primero al ARN y luego a las proteínas --> existe un flujo de información.

Se da así, un cambio de información de una secuencia de bases a una secuencia de aa, que constituyen el **CÓDIGO GENÉTICO**, que son las claves por las que una secuencia de bases del ADN se transforma en proteínas.

una sec. de 3 bases (ADN o ARN) -----> posición de un aa

CODÓN determinan

El código genético es el conjunto de codones. Algunas de las características más importantes de este código son las siguientes:

- **un codón** es un **conjunto de 3 bases** de ARN (A, C, G, U)
- Como hay **4 bases diferentes**, tenemos 64 posibles combinaciones=**64 codones** que **determinan la posición de 20 aa en las proteínas**. Hay más codones que aminoácidos. Ahh pero hay problemillas...no todo es tan fácil....
- hay codones que no codifican para ningún aminoácido. Son **codones de terminación**: UAA, UAG, UGA. Su presencia determina el fin de la síntesis de proteínas.
- hay un **codon de iniciación**, que siempre aparece al principio. Va a codificar el primer aa de una proteína. AUG, que codifica en eubacterias la N-Formilmetionina, mientras que en arqueobacterias y eucariotas codifica para la Metionina.
- el resto de los codones codifican para aminoácidos: **60 codones** para **19 aa** distintos.
- es **redundante=está degenerado**. Esto quiere decir que puede haber más de un codon para un mismo aminoácido. Lo contrario no ocurre nunca, no tenemos o no existen 2 aminoácidos para un mismo codón.

Ejemplo: Gly -----> GGG la redundancia suele aparecer

GGU en la tercera base (casi siempre)

GGA

GGC

– es **universal**, es válido para todos los seres vivos, con algunas excepciones. Esto significa que el código genético se estableció así en una etapa muy lejana, al principio de todos los seres vivos.

– su **lectura es secuencial**, los codones van unos detrás de otros y **no hay solapamiento de codones**, ni tampoco de genes. Pero aquí también hay excepciones: como es el caso de un VIRUS BACTERIÓFAGO Φ x174, que tiene ADN de cadena sencilla con 5386 bases (1795 codones --> pueden codificar para 1795 aa). Teniendo en cuenta que una proteína media-pequeña tiene 400 aa, el virus puede codificar para 4 ó 5 proteínas --> NO ES ASÍ, obtiene información para 11 proteínas. Aquí tenemos presente el solapamiento de genes.

gen A gen B

-----|-----|-----

gen C

MARCO DE LECTURA, son las bases contenidas en un gen. Cada gen tendrá un codon de iniciación (AUG), n codones de 3 bases cada uno y al final un codon de terminación.

codon de iniciación n codones de 3 bases codon de terminación

AUG-.....-ACG-CCC-CUA-.....-UAA, UAG o UGA

GEN=UNIDAD DE EXPRESIÓN GENÉTICA, el conjunto de genes de un organismo se denomina **GENOTIPO**. También se suele llamar **GENOMA** de un organismo, a todo el material genético (que es autorreplicable, codificable y transferible a otro organismo).

En bacterias, este material genético está constituido por un único cromosoma, también llamado **GENÓFORO**, de doble cadena, circular y cerrada. Además, también existen **PLÁSMIDOS**, que son moléculas de ADN circulares y cerradas, que pueden ser transferidas a otras células y a la descendencia.

Un plásmido se diferencia del cromosoma en que es más pequeño y no son necesarios para la célula, aunque puede beneficiarla mucho en determinados ambientes (sobre todo los adversos).

También podemos considerar como material genético los virus y elementos transponibles (fragmentos de ADN que pueden ir de un sitio a otro).

FENOTIPO, es la expresión del genotipo, es decir, el conjunto de caracteres que se pueden observar en un organismo. En el fenotipo, sólo se expresa una parte del genotipo (sólo hay unos cuantos genes que se transforman en proteínas). El ambiente, determina la porción de genotipo que se expresa fenotípicamente. Podríamos decir que:

FENOTIPO = GENOTIPO + AMBIENTE

MUTACIÓN, como consecuencia de cambios en el material genético, pueden existir formas alternativas de un gen, que es lo que se conoce como **ALELOS**. En bacterias, el **alelo** más frecuente en una población, es el **salvaje** y se supone que las otras alternativas se forman por mutación de ese alelo: se da lugar a los **alelos mutantes**. Esta palabra, se usa para expresar un alelo defectuoso, aunque no significa que todos sean así.

Todos los procariotas tienen un sólo cromosoma (son haploides --> únicamente una copia de cada gen). En organismos eucariotas, en general son diploides (2 copias de cada gen) --> pueden ser homocigóticos (2 alelos=) o heterocigóticos (alelos distintos).

MATERIAL DE ESTUDIO, en cualquier trabajo que realicemos, lo que manejamos son **CLONES** (poblaciones de bacterias genéticamente igual entre sí, pero diferentes de otras bacterias semejantes). Esta población proviene de una sola célula que por división, origina esta población de células iguales. Ejemplo: cuando una bacteria se multiplica en un medio sólido, da lugar a una colonia con todos los individuos iguales entre sí, porque todos provienen de una única célula.

Ventajas de estudiar la GENÉTICA MICROBIANA:

- los procesos genéticos de microorganismos son semejantes a procesos genéticos de organismos superiores. Es decir, la genética de microorganismos=genética de org. superiores.
- tamaño muy pequeño de microorganismos, por lo tanto fáciles de manipular.
- tienen un tiempo de generación relativamente corto, enseguida podemos obtener descendencia.
- la anterior característica, implica la posibilidad de obtener, en poco tiempo, una población de células.
- sólo tienen un cromosoma, su material genético tiene una estructura muy sencilla. Su tamaño medio es de 3,8.10⁶ pares de bases y mide 1mm. Ejemplo: cromosoma de E. Coli. El tamaño del cromosoma depende de la capacidad metabólica del microorganismo en cuestión (a mayor capac. metabólica, mayor tamaño). Por

ejemplo: Desulfovibrio (anaerobia estricta) es muy pequeña.

– son haploides, un alelo de cada gen, por lo que una mutación va a tener una manifestación inmediata.

Inconvenientes:

– debido al tamaño tan pequeño, no se pueden manejar individuos solitarios, siempre estudiamos poblaciones de bacterias. Aunque hemos dicho, que en general las poblaciones son de células iguales entre sí, pueden aparecer mutaciones al cabo del tiempo.

– no tienen reproducción sexual, por lo que no tienen posibilidad de dispersar los cambios genéticos que sufren, entre los organismos de una población. Además, tampoco pueden generar variabilidad por recombinación. Lo que si tienen es otros mecanismos que si van a permitir la recombinación (una especie de recombinación especial para bacterias).

gENERACIÓN mICROBIANA

GENERACIÓN DE VARIABILIDAD

Mutación (alteración de la secuencia...) Recomb. genética

– **transformación**

– **transducción**

– **conjugación**

MUTACIÓN Y MICROORGANISMOS MUTANTES

Una **mutación** es un cambio en la molécula de ADN, que es permanente y se transmite a la herencia.

Un microorganismo que sufre una mutación, se denomina **microorganismo mutante** o **cepa mutante**, al contrario de la que no lo sufre, que se llama **microorganismo** o **cepa salvaje**.

Un tipo de mutación es la conocida como **mutación por SUSTITUCIÓN DE BASES**. Este tipo de mutación provoca el cambio de una aminoácido en la proteína, con las consecuencias que ello genera para la proteína. La principal consecuencia es que se puede llegar a la pérdida de la actividad de dicha proteína.

Dentro de la sustitución de bases puede haber dos tipos:

– **transición**, purina x purina, pirimidina x pirimidina

– **transversión**, purina x pirimidina, pirimidina x purina

AGA -----> codon para la Arg (+)

AGC -----> codon para la Ser (polar)

GGA -----> codon para Gly

GGC -----> "

GGG -----> "

GGU -----> "

UGA -----> **codon sin sentido, codon de terminación**

GUA -----> **codon para la Val**

GAA -----> **codon para Glu (-)**

1.- en el paso de AGA --> GGA, se va a sintetizar una proteína en la que ha cambiado un aminoácido con carga positiva, a un aminoácido con carga -. Esto puede tener consecuencias en la proteína si el aa que ha cambiado es importante para determinar la estructura terciaria (al perderse la carga, se pierde, por tanto, la capacidad de plegarse de la proteína) de la proteína, o en el centro activo si la proteína es una enzima --> será una proteína defectuosa, que habrá perdido su función: es una **proteína mutante**. Ha habido un cambio en el genotipo que se manifiesta como un cambio en el fenotipo.

2.- en el caso de que pasemos de GGA --> UGA, la proteína no acaba de sintetizarse. Aparece una **proteína truncada**, que casi seguro será defectuosa --> mutación que se manifiesta en el fenotipo.

3.- si cambia la tercera base de GGA --> GGG, GGC, GGU; no tenemos un cambio en la secuencia de aminoácidos --> por lo tanto, no hay cambio en la proteína. Tenemos una mutación que no se manifiesta en el fenotipo, es una **mutación silenciosa**.

4.- paso de GGA --> GUA. En este paso hay una nueva mutación, pero esta no es más grande (menos polaridad, no polares,...). No va a afectar a la estructura terciaria de la proteína, y también es una mutación silenciosa (no se manifiesta en el fenotipo).

Otro tipo de mutación es la **DELECCIÓN**, que consiste en la desaparición de una base, que origina un cambio del marco de lectura (es conocida también como mutación por desfase). Los codones siguientes, son diferentes y por tanto, la secuencia de aa cambia a partir de la mutación (del punto donde se ha producido).

Igual que hay delección también tenemos **ADICIÓN DE UNA BASE**. La delección o adición de 3n bases, provoca la pérdida o adición de n aminoácidos en la proteína. Duplicación de un fragmento de ADN --> si el fragmento contiene un gen, se dobla la capacidad para sintetizar una proteína.

Conocemos como **INVERSIÓN**, al proceso mediante el cual, un fragmento de ADN cambia de sentido. **TRANSPOSICIÓN**, es un fragmento de ADN que cambia de lugar en la molécula.

Los **agentes mutágenos** son aquellos que aumentan la frecuencia de mutación. Sólo vamos a estudiar la **luz ultravioleta** --> que daña al ADN provocando dímeros de T (covalente), cuando esta molécula se vaya a replicar van a aparecer errores. La bacteria tiene mecanismos para reparar los dímeros de timina, es el denominado sistema SOS. En él, participan diferentes enzimas entre las que destaca la Rec A.

En primer lugar actúa la endonucleasa, que rompe la cadena de ADN por ambos lados del dímero de timina. Otra enzima, la exonucleasa, va quitando nucleótidos a partir de los extremos de la cadena rota (amplía el hueco dejado por los dímeros de timina). En una tercera etapa, llega la ADN polimerasa, que forma una nueva cadena de ADN usando como molde la cadena intacta. Al final, las ligasas unen los fragmentos de ADN.

Si el daño es muy grande (mucha luz ultravioleta) el sistema SOS induce mutaciones --> provoca muchas, con la esperanza de que entre tantos mutantes haya alguno que pueda sobrevivir a la radiación ultravioleta.

MANIFESTACIONES FENOTÍPICAS DE MUTACIONES EN MICROORG.

- la mutación puede producir la pérdida de la movilidad. Si la mutación está motivada por **flagelos**, puede ser debida a que en la mutación, o no se forman flagelos o los que se forman sean defectuosos.
 - pérdida de la capacidad de formar **esporas o conidios** (hongos).
 - capacidad de formar cápsula bloqueada --> generalmente son patógenos, por lo que pierden esta patogeneidad.
 - resistencia a fagos, a la acción de antibióticos y otros compuestos químicos.
 - cambio en la susceptibilidad de las proteínas a ser degradadas por proteasas. También puede afectar a la estabilidad de la proteína frente al calor.
 - cambio de la capacidad de utilizar un determinado azúcar como fuente de carbono --> **mutantes de utilización de azúcares**. Ejemplo: mutación en la capacidad de una bacteria de usar lactosa como fuente de carbono. En este caso, se dice que la bacteria mutante se llama **Lac -**, mientras que la cepa salvaje es **Lac +**.
 - **mutantes nutricionales**, la mutación afecta a una ruta biosintética. Los mutantes no sintetizan un compuesto, requiere que el compuesto se añada al medio para poder crecer. Se dice que un mutante es **auxótrofo**, cuando requiere imperiosamente un compuesto determinado, y se denomina **salvaje protóforo**, cuando no requiere dicho compuesto.
- Ej: Auxótrofo, para la biosíntesis de Arg --> Arg -. No sintetiza Arg, ni crece en su ausencia. Protóforo, Arg +, sintetiza Arg y puede vivir en su ausencia.

CARACTERÍSTICAS DE LAS MUTACIONES

- son espontáneas, ocurren al azar.
- son independientes de las ventajas adaptativas que confiere la mutación.

Ejemplo: hay mutantes que son resistentes a antibióticos. Se han formado a partir de una cepa salvaje sensible a un antibiótico. El paso de la cepa salvaje a la mutante, ocurre por mutación. El mutante tiene ventajas adaptativas, pero esta mutación no se ha dado por esta ventaja.

- las mutaciones se dan con una cierta frecuencia, y van a depender de diversos factores:
- tamaño del gen
- secuencia de bases (por la tautomería)
- secuencia de aminoácidos en la proteína (depende del aa que cambie)

Secuencia histórica del descubrimiento/estudio de las mutaciones...

Alrededor del año 1940, se pensaba que las mutaciones no eran espontáneas, sino inducidas por un agente selectivo. Se pensaba de esta forma, porque si cultivábamos bacterias sensibles a un antibiótico determinado (en un medio sólido) con dicho antibiótico, era frecuente que hubiera colonias resistentes al antibiótico --> entonces, por esto se pensaba que era el mismo antibiótico el que producía la mutación.

Pero en los años 50's, usando una cepa de E. Coli susceptible al fago T1 (E. Coli T1-s). Se usó la técnica llamada **RÉPLICA EN PLACA**, muy usada en genética de microbiología. En primer lugar, se hace crecer una población de bacterias en un sólido que está en una placa petri con una señal para conocer donde están las colonias.

Sobre esta placa crecen colonias de bacterias. En ese momento, colocamos una tela de terciopelo, que se encuentra sobre un soporte sólido con un diámetro menor al de la placa petri --> la tela queda en contacto con las colonias y alguna célula puede quedar atrapada. A continuación, ponemos en contacto la célula con una placa virgen (también con una señal) --> se lleva a incubar y al cabo de un tiempo, vemos la formación de colonias en la otra placa, con una posición idéntica a la de la placa original.

En el experimento se inoculó primero la E. Coli en un medio no selectivo (en ausencia del fago T1), entonces aparecen una serie de colonias. Se replicó la placa varias veces a placas vírgenes, con el fago T1 en una concentración suficiente para matar todas las células sensibles de E. Coli. Se dieron cuenta que había algunas colonias que resistían en todas las placas.

Todas estas cepas eran resistentes (E. Coli T1-r) y habían mutado en un medio sin T1.

AISLAMIENTO DE MUTANTES

Para aislarlos, necesitamos primero una población de bacterias, en la que habrá bacterias de la cepa salvaje y de la cepa mutante. Después, necesitamos saber cual es cada una de ellas --> necesitamos un medio que nos permita seleccionar el mutante. Este mutante va a estar en una proporción menor: para poder aislarlo necesitamos también un medio de enriquecimiento de la población mutante.

Las técnicas son:

1.- Aislamiento de mutantes resistentes a antibióticos (a un fago o a un compuesto químico). Es el método más sencillo --> inoculamos gran cantidad de bacterias (la mayoría serán sensibles y unas pocas resistentes) en una placa de medio sólido, al que hemos añadido el antibiótico --> va a matar a la mayoría de las bacterias, pero van a aparecer unas cuantas bacterias resistentes.

Para obtener el cultivo puro: cogemos una colonia y la inoculamos de nuevo en una placa con antibiótico --> hacemos siembra en estría.

Cogemos la colonia más separada y la llevamos a un cultivo en medio sólido. Se dice que la selección se hace por un método de **selección directo y positivo**, porque sólo crecen las bacterias que queremos y nos interesan.

2.- Aislamiento de mutantes de utilización de azúcares. Estos mutantes son incapaces de usar un determinado azúcar como fuente de C (Ejemplo: Lac -, significa que no podemos usar la lactosa, pero sí otro compuesto como fuente de C).

Para aislar estos mutantes, se usa una placa petri con un medio sólido que contiene el azúcar que no puede ser usado por el mutante (en el ejemplo, lactosa). Tiene además, otro compuesto que puede ser usado como fuente de C y un indicador de color, es en concreto, el medio usado en el ejemplo es MacConkey-lactosa.

En esta placa inoculamos la población de bacterias (entre las que habrá Lac + y Lac -). Las colonias Lac + fermentan la lactosa, y adquieren un color rosa (debido a que en la fermentación se produce ácido, baja el pH y hay un cambio de color en el indicador). Aparecen algunas colonias (pocas) de color blanco --> Lac -, que pueden crecer en este medio porque usan la otra fuente de C --> no fermentan, ni producen ácido, por lo que no cambia el color del indicador. A partir de estas colonias hacemos el aislamiento (seguramente por siembra en estría en el medio).

La **selección** también es **directa** (la bacteria crece) pero **negativa** (no presenta el carácter, el color rojo).

3.- Aislamiento de mutantes auxótrofos. Son los que tienen alterada una ruta metabólica biosintética, y por lo tanto son incapaces de sintetizar un compuesto.

Ejemplo: Leu - (auxótrofo para leucina) --> no crece en ausencia de leucina. La Leu + es la cepa salvaje (prototrofo) --> puede crecer en ausencia de leucina.

El método usado es el método de réplica en placa. En este método, partimos de un cultivo de una cepa bacteriana y en él la mayoría de las bacterias son los prototrofos Leu +, aunque también habrá bacterias en minoría como los auxotrofos Leu -, que son los que queremos aislar.

Lo que hacemos es inocular una placa de medio sólido (por ejemplo Agar nutritivo) con Leu y con el cultivo (la placa también tiene una señal para conocer la posición). Se incuba la placa, y aparecen colonias de bacterias, la mayoría Leu + y algunas Leu -. Todavía no las podemos diferenciar. A partir de esta placa (placa maestra) hacemos réplica en dos placas más (el rollo ese del terciopelo).

A la primera placa, la llamamos **placa de referencia**, que contiene un medio mínimo al que hemos añadido Leu.

A la segunda, la llamamos **placa test**, contiene medio mínimo (sales, agua + fuente de C) sin Leu.

Cuando incubamos:

- en la placa de referencia aparecen iguales colonias y en iguales posiciones que en la placa maestra.
- en la placa test parecen algunas colonias en iguales posiciones que en la placa maestra --> todas serán Leu +.

Con esto, ya podemos saber cuales son las auxotrofas => las que crecen en la placa de referencia, pero no en la placa test. Ahora hay que aislarlas en un cultivo puro. Para hacerlo, podemos tomar una muestra y hacer una siembra en estría por agotamiento, por supuesto, en un medio con Leu.

Esto tiene un problema: existen muy pocas Leu - en el cultivo (una o unas cuantas entre un millón) --> para que apareciera una colonia de auxotrofos, necesitamos hacer cientos de réplicas en placa. Para solucionar esto, necesitamos aumentar mucho la proporción de auxotrofos, para lo que hay dos posibilidades (se realizan al principio del proceso):

- aplicando agentes mutágenos que aumentan la frec. de mutaciones
- selección por penicilina: sólo se puede aplicar en el caso de que las bacterias sean sensibles al antibiótico. Se basa en que la penicilina únicamente mata a las bacterias que están creciendo, es decir, o las bacterias que sintetizan activamente la pared celular (porque inhibe la formación de puentes de peptidoglicanos). Si partimos del mismo cultivo de antes (muchas Leu +, muy pocas Leu -), lo pasamos a un matraz con medio líquido sin leucina, pero con penicilina. Lo incubamos durante un cierto tiempo --> la Leu + crece pero muere por la acción de la penicilina. Los pocos auxotrofos no crecen (no existe leucina) por lo que no mueren por un tiempo --> hemos reducido la proporción Leu + y aumentado la proporción de Leu -.

Del matraz, lo pasamos a una placa maestra (con Leu) donde crecen las Leu + y Leu -. De esta placa ya si hacemos la réplica a la placa de referencia y a la placa test. Luego aislamos el cultivo puro. La **técnica es negativa** (no crece en el medio) e **indirecta** (como no crece hay que cogerla de otra placa).

rECOMBINACIÓN gENÉTICA eN bACTERIAS

La recombinación mezcla elementos genéticos (genoma o partes de un genoma) de dos células diferentes en una misma célula, dando lugar a un nuevo genotipo. Tiene como consecuencia la dispersión de la variabilidad genética entre organismos de una población, y la transmisión de caracteres genéticos entre individuos de una población.

En la recombinación tiene lugar el apareamiento de moléculas de ADN, que son homólogos y el intercambio de estas cadenas de ADN. Se forma un genotipo recombinante:

En eucariotas, la recombinación tiene lugar durante la reproducción sexual. En ella se forman gametos haploides y durante la fecundación, se fusionan y forman un cigoto diploide.

En bacterias no existe la reproducción sexual, pero si tenemos recombinación --> tiene lugar mediante la transferencia de una porción del genoma de una bacteria dadora denominada **EXOGENOTE** a una bacteria aceptora o **ENDOGENOTE**. Como consecuencia, se forma un **MEROCIGOTO** (zigoto parcial). Este merocigoto contiene el genoma entero de la célula aceptora y sólo una parte de la célula dadora.

Si hay existe homología (contienen iguales genes pero diferentes alelos) entre la parte de genoma de la dadora y la aceptora, hay recombinación, con intercambio de cadenas de ADN.

En bacterias, la recombinación es ocasional (sólo de vez en cuando), fragmentaria (sólo se recombina parte del genoma) y no es necesaria para completar el ciclo de vida de las bacterias. Lo que sí es beneficioso es para la población.

MECANISMOS DE RECOMBINACIÓN

Hay tres tipos:

tRANSFORMACIÓN: la célula aceptora toma genes de una molécula de ADN (de la célula dadora) que se encuentra en el medio que rodea a la célula aceptora.

La célula dadora se fragmenta, y también lo hace la molécula de ADN. Uno de estos fragmentos es captado por la célula aceptora, si hay segmentos homólogos tiene lugar el intercambio de cadenas de ADN --> **RECOMBINACIÓN** propiamente dicha.

El descubrimiento de la transformación fue muy importante, ya que permitió conocer cual era la naturaleza del material genético --> se conoció que era el ADN.

Una primera parte del descubrimiento fue realizado por Griffith en 1924. Estaba estudiando la bacteria *Streptococcus pneumoniae*, que causa neumonía en el hombre y en el ratón. Es patógena porque posee una cápsula de polisacáridos, que rodea a la bacteria y que permite que la bacteria escape a los sistemas de defensa de un animal hospedador vertebrado. El sistema de defensa consiste en que el animal células, que son macrófagos que fagocitan células extrañas. La cápsula de esta bacteria hace que no se una al macrófago e impide la fagocitosis. Así, da lugar a un mayor número de bacterias que se localizan en los tejidos del pulmón, provocando que éste no funcione con normalidad.

Cuando esta bacteria crece en un medio sólido, forma colonias de aspecto liso --> cepa S (smooth=liso). Puede ser que haya cepas mutantes que hayan perdido la cápsula, y que no sean patógenas. Esta cepa, cuando crece en un medio sólido da lugar a colonias de aspecto rugoso --> cepas R (rough=rugoso).

Griffith inoculó ratones con *Streptococcus pneumoniae*.

- Si la bacteria es de la cepa S, al cabo de un tiempo la colonia muere.
- Si la bacteria es de la cepa S, pero está muerta, el ratón vive.
- Pasa lo mismo si le inyecta bacterias de la cepa R vivas.
- Si inocula bacterias de la cepa R vivas y de la cepa S muertas, el ratón moría al cabo del tiempo de neumonía. Además, del ratón se extraían bacterias de la cepa S vivas, que si se inyectaban a otros ratones, provocaban la neumonía.

Lo que había pasado es que las bacterias R se habían transformado en bacterias S. Debía haber algo en las bacterias S que produjese este cambio, pero Griffith no lo descubrió. No se pudo descubrir hasta 20 años más tarde, cuando tres investigadores: Avery, McLeod y McCarty (1944) completaron las investigaciones de Griffith.

Tomaron células S y las fraccionaron: obtuvieron proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos... que fueron añadiendo de una en una a bacterias R. Observaron que al añadir ADN de bacterias S, las bacterias R se transformaban en bacterias S --> tenían cápsula y eran patógenas. De ahí sacaron la conclusión de que la molécula en la que se encuentra la información es el ADN.

No todas las células pueden realizar la transformación. Ésta ocurre sólo en algunas cepas bacterianas de algunos géneros, como *Streptococcus*, *Hemophilus*, *Bacillus*, *Veissaria* y *Pseudomonas*. En cada género, el mecanismo de transformación es diferente. Nosotros vamos a ver el mecanismo de transformación de *Streptococcus*. Para que se pueda dar la transformación, la célula ha de ser **competente** para transformarse --> producción de una proteína llamada **factor de competencia**. Esta proteína es liberada al exterior por la célula (en el crecimiento). Cuando se llega al fin de la etapa exponencial del crecimiento, este factor alcanza una concentración crítica que permite que la célula sea competente --> se une a un receptor específico de la pared celular, que provoca que tenga lugar la expresión de una serie de genes cuyos productos genéticos van a participar en el proceso de la transformación. Una de estas proteínas, es la autolisina (enzima que puede romper los polisacáridos de la pared celular) --> actúa sobre la pared y pone al descubierto dos proteínas que ya estaban en la pared celular, pero ocultas.

De estas proteínas, una es una nucleasa y la otra es una proteína de unión al ADN. La molécula de ADN de la célula dadora (libre en el medio) se une a la pared celular gracias a las proteínas de unión. La nucleasa hidroliza una de las dos cadenas de ADN, la otra entra dentro de la célula. En el interior, se va uniendo a proteínas de unión de ADN, que hacen que la molécula permanezca estirada y evita que sea deformada. Si esta cadena que ha entrado es homóloga a algún fragmento del cromosoma de la célula receptora, habrá **recombinación**.

Así se produce una transformación natural. En el laboratorio, se puede hacer una transformación artificial, que permite introducir ADN exógeno=extraño en una bacteria o en un hongo. El ADN exógeno puede pertenecer a cualquier otro tipo de ser vivo. Este ADN no se encuentra en fragmentos, sino que se encuentra incluido en un plásmido.

Este plásmido se dice que actúa como **vector de transformación**. También pueden actuar así algunos virus y cromosomas artificiales.

Para introducir el ADN exógeno en una bacteria, se trata dicha bacteria con cationes divalentes, como por ejemplo el Ca^{++} (no se sabe por qué, pero alteran la pared y permiten la entrada de ADN). También se usa un disparador de partículas (dispara moléculas de ADN, que entran en la bacteria) o la **electroporación** (se somete a la bacteria a campos eléctricos pulsantes que producen poros en la pared, por donde puede entrar el ADN).

Si queremos introducirlo en un hongo, eliminamos la pared celular con enzimas hidrolíticas --> obtenemos así el **protoplasto** (célula del hongo, rodeado por la membrana). Si añadimos el ADN, puede entrar en la célula. Al cabo de un tiempo, el protoplasto regenera la pared celular.

La transformación artificial de hongos y bacterias es importante, porque nos permite usar los microorganismos para sintetizar proteínas de cualquier origen, por ejemplo, nos permiten obtener vacunas recombinantes, como la vacuna contra el virus de la Hepatitis B. Esta vacuna consiste en una proteína de la cápsida del virus. Esta proteína se consigue de una levadura (*Sacharomice cerevesiae*) a la que se le introduce el ADN exógeno que codifica para una proteína del virus de la hepatitis B. La levadura produce gran cantidad de la proteína viral, se purifica y se usa como vacuna. Así, evitamos tener que manejar el virus en el laboratorio.

TRANSDUCCIÓN: es un mecanismo de recombinación genética en bacterias, que está mediado por un virus bacteriano denominado bacteriófago=fago. En este proceso, la célula dadora es en primer lugar infectada por un fago. Se forma así una partícula viral que está defectuosa, y que contiene parte del ADN del fago y parte del ADN de la bacteria. Ahora, esta partícula viral se llama **partícula transductora** y es capaz de infectar a una bacteria receptora. De esta manera hay una transmisión de ADN de una bacteria dadora a una bacteria receptora, a través de un fago. Un fago que infecta a una bacteria forma lo que se denomina **partícula viral**, que está constituido por una cápsida de proteínas y en su interior está el genoma viral (la mayoría de bacterias tienen ADN de cadena doble). Cuando un fago infecta a una bacteria, tiene lugar lo que se llama el **ciclo de replicación viral**, cuyo objetivo es la formación de numerosas partículas virales.

Este ciclo de replicación viral finaliza normalmente con la lisis de la bacteria. Por eso también se le llama **ciclo lítico**.

cápsida

ADN viral

ADN bacteriano

Para que un fago infecte a una bacteria, tiene que ocurrir que este fago se una a la superficie de la bacteria. Es una unión específica y está regulada por receptores que se encuentran en la superficie de la bacteria y reconocen de forma específica proteínas de la cápsida. Después de la unión, tiene lugar la penetración del ADN viral. A continuación, el ADN del fago se multiplica dentro de la bacteria, mientras que normalmente el ADN de la bacteria es degradado. Cuando se ha multiplicado el ADN viral, se sintetizan las proteínas de la cápsida del virus. Después, tiene lugar el ensamblaje de las proteínas de la cápsida y el ADN viral, formándose nuevas partículas virales. Finalmente, la bacteria se rompe y se liberan las partículas virales, que pueden volver a infectar nuevas bacterias.

Durante el ciclo de reproducción del fago, se forma una partícula defectuosa dentro de la bacteria, que contiene parte del ADN del fago y parte de la bacteria. Se llama a esta partícula, **partícula transductora**. Esta partícula puede infectar a otras bacterias.

La partícula transductora es defectuosa porque no tiene completo el ADN viral, por lo que al infectar a otra bacteria no se puede reproducir, no tiene información suficiente para todas las partes. Pero las proteínas de la cápsida son normales, por lo que la partícula transductora puede unirse a los receptores de la superficie de la pared de la bacteria e introducir el ADN en su interior (pero es un ADN que no es completo).

Con este proceso, la bacteria receptora recibe un fragmento de ADN de una bacteria dadora. Si este fragmento de ADN exógeno es complementario con el del ADN de la bacteria, hay apareamiento y recombinación entre ambas moléculas de ADN.

CONJUGACIÓN: es un mecanismo de recombinación en bacterias que requiere el contacto directo entre dos bacterias.

Es un proceso polarizado, es decir, siempre va en la misma dirección, por lo que hay células dentro de una población de bacterias que siempre actúan como dadora $\rightarrow F^+$ o Fertilidad +, y luego hay otras que actúan siempre como aceptoras $\rightarrow F^-$ o Fertilidad -.

Sólo las células F^+ contienen un plásmido llamado **factor F**. Durante la conjugación, tiene lugar la copia y transferencia del factor F desde la célula F^+ a la F^- . Así, al final de la conjugación se obtienen dos bacterias F^+ $\rightarrow$ la que era F^+ sigue conservando el plásmido y la F^- se transforma porque adquiere el factor F. Este mecanismo de recombinación en bacterias es muy importante porque también se van a transferir los caracteres genéticos que están codificados en el factor F. Entre los caracteres puede haber en un factor F, se encuentran por ejemplo, los que confieren resistencia a los antibióticos. Así, si un individuo de la población presenta resistencia a los antibióticos, esta proporción se va a extender a toda la población.

Las etapas de la conjugación son:

- Contactos entre bacterias F^+ y F^- a través de las fimbrias. Los genes para la formación de estas fimbrias, está en el factor F, por lo que sólo van a poder tener estas estructuras las F^+ .
- Movilización del plásmido, que consiste en la rotura de una de las dos cadenas del factor F, en una secuencia det. llamada **sitio oriT**. La enzima que corta el ADN es una endonucleasa que también está codificada por el factor F.

Una vez que tiene lugar la rotura de la cadena, se da la replicación o duplicación de la cadena que permanece cerrada. Esto causa el desplazamiento de la cadena abierta y que es transferida a la c. receptora a través de la fimbria.

- cuando se acaba esto, tenemos que la célula que era F^+ conserva el factor F completo y la F^- ha recibido una cadena del plásmido.
- replicación de la cadena transferida.
- se rompe el contacto entre las células y al final las bacterias son F^+ .

El factor F tiene una propiedad $\rightarrow$ se puede integrar en el cromosoma de la bacteria. Así, una bacteria que tiene el factor F integrado en el cromosoma, se dice que es una bacteria **Hfr** (alta frecuencia de recombinación). Se produce porque hay unos fragmentos en el cromosoma de la bacteria y del plásmido, que son homólogos y se llaman **SI** (secuencia de inserción), pueden aparear y puede haber recombinación entre ellos $\rightarrow$ obtenemos una gran molécula de ADN que contiene el factor F entre dos SI.

También puede conjugarse Hfr y F^- . Durante este proceso hay una transferencia y movilización del plásmido enganchado al cromosoma. Un fragmento del factor F se rompe y ahí comienza la conjugación. Normalmente sólo se transfiere parte del factor F y parte del cromosoma.

Como casi nunca la transferencia es completa, la célula F^- recibe parte del factor F y parte del cromosoma. Así, al final sigue siendo F^- porque no ha recibido todo el plásmido.

Si hay recombinación y apareamiento entre Hfr y F^- $\rightarrow$ pasa parte del cromosoma de la Hfr a la F^- .