

# **MICROBIOLOGÍA**

*3º CURSO DE BIOLOGÍA*

**(PRIMER PARCIAL)**

**SERENA PATRICIA RODRÍGUEZ PÉREZ**

**ÍNDICE PARCIAL I**

- ◆ TEMA 1: La microbiología y su desarrollo histórico.
- ◆ TEMA 2: Los microorganismos en la escala biológica.
- ◆ TEMA 3: Observación de los microorganismos.
- ◆ TEMA 4: Cultivo de microorganismos.
- ◆ TEMA 5: Esterilización y desinfección.
- ◆ TEMA 6: La célula procariota: Pared celular.
- ◆ TEMA 7: Flagelos y movilidad. Apéndices celulares. Formas de resistencia.
- ◆ TEMA 8: La célula procariota: citoplasma, orgánulos citoplasmáticos y región nuclear.
- ◆ TEMA 9: La célula eucariota.
- ◆ TEMA 10: Metabolismo microbiano: Obtención de energía.
- ◆ TEMA 11: Generación de energía (continuación).
- ◆ TEMA 12: Regulación del metabolismo microbiano
- ◆ TEMA 13: El crecimiento microbiano.
- ◆ TEMA 14: Sistemas de crecimiento controlado de microorganismos.
- ◆ TEMA 15: Efecto de los factores ambientales sobre el crecimiento de microorganismos.

**TEMA 1.- LA MICROBIOLOGÍA Y SU DESARROLLO HISTÓRICO.****INTRODUCCIÓN.-**

(pág. 20 Brock)

La microbiología se define como *la ciencia que estudia los microorganismos*.

Los microorganismos forman una gran variedad de organismos con tamaño microscópico (inferior a 1mm de diámetro), con una organización simple (unicelulares, agregados celulares indiferenciados, etc.).

La célula puede realizar todos los procesos vitales: nutrición, generación de energía y reproducción.

.- Tipos:

- 1.- **Procariotas:** las bacterias
- 2.- **Eucariotas:** algas, hongos y protozoos.

La microbiología estudia también los *virus y partículas subvirales*, también la interacción de microorganismos con otros seres vivos y su implicación en el reciclaje de la materia. También estudia los aspectos aplicados de microorganismos, como su uso en la industria, medicina, agricultura, etc.

**ETAPAS EN EL DESARROLLO HISTÓRICO.-**

\* **1.-** La microbiología comienza al descubrirse los microorganismos. Se descubrieron por **Antonie van Leeuwenhoek** en el S.XVII (1620-1630). Era un comerciante de telas holandés habilidoso en la construcción de microscopios. Consiguió microscopios simples (de una sola lente) que le daba un aumento de hasta 300 veces. Observó muchos objetos, semillas, células sanguíneas, etc. pero también descubrió los microorganismos, los llamó **Animálculos** (1632) (bacterias, algas, hongos y protozoos). Mandó sus cartas a la Royal Society de Londres que las tradujeron y obtuvo difusión. Muere en 1750 y con él el interés por la microbiología

Hasta mediados del S.XVIII no se reprodujeron sus descubrimientos ya que los científicos de la época usaban microscopios compuestos con muchos errores ópticos. El holandés no quiso donar sus microscopios ni enseñar a nadie. Se conservan 200-300 de

sus microscopios que eran muy buenos, aunque él los usaba bien debido a su gran miopía.

**Robert Hooke** no pudo repetir estos experimentos, incluso con los microscopios compuestos. En 1820 se incorporaron técnicas en la mejora de la microscopía.

\* 2.- Al descubrirse los microorganismos se volvió a hablar de la generación espontánea (abiogénesis) en contraposición con la otra teoría que partía del desarrollo a partir de semillas que estaban en el aire (biogénesis Leeuwenhoek creía en esta teoría).

- **Redi** en 1665 demostró que los gusanos de la carne no surgían de ésta, sino que eran estados larvarios de moscas (cubrir la carne con una gasa y no aparecen gusanos). Acaba con la idea de la generación espontánea en el mundo macroscópico, pero se refuerza en el microscópico.
- **Lázaro Spallanzani** (S.XVIII) fue el primer científico que aportó datos contra la teoría de la abiogénesis, intentó demostrar que los microorganismos existen en el aire, para ello introdujo una solución en un matraz la esterilizó con calor y al sellarla se mantenía estéril indefinidamente. Pero Lavoisier y otros químicos (Cavendish) descubren la existencia del oxígeno y dijeron que el oxígeno era esencial y en el matraz no había, así **Needham** propuso que los tapones impedían la llegada del oxígeno.

Esto fue refutado por **Schulze/Schwann** que pasaron aire previamente tratado o bien con repetidos pasos por calor o bien pasando por soluciones ácidas. Llegaba el aire pero no se contaminaba.

En esta época reinaba el vitalismo, por esto surgió la biología, la existencia de una fuerza vital que era matada por el calor era lo que impedía la vida

Más tarde **Sroeder/von Dush** pasaron aire a las infusiones filtradas por algodón y se contaminaban.

- **Pochet** estaba a favor de la abiogénesis.
- **Appert**, comerciante francés, usó los procedimientos de Spallanzani para esterilizar los alimentos (Apertización), se estudió por Europa, era el Baño María.
- **Pasteur** químico francés (1861), se basó en Spallanzani y desechó la generación espontánea en un trabajo llamado “Memoria sobre los cuerpos organizados que existen en el aire”. Demostró:
  - .- La existencia de microorganismos (cuerpos organizados en el aire)
  - .- No existe contaminación en matraces abiertos de cuello curvo.

Pasteur tomó un filtro con algodón de pólvora y hace pasar aire por él, luego lo mete en alcohol y lo examina al microscopio observando microorganismos.

Se siguió manteniendo la generación espontánea por algunas partes. Pasteur usó matraces con cuello de cisne que contenían una infusión calentada, ésta no se contaminaba a menos que se volteara el matraz.

- **Tyndall** (1877) era de la escuela de Pasteur. Trabajaba con heno seco, añadía éste a una solución estéril y realizaba el proceso de Pasteur, al analizarlo seguía habiendo crecimiento microbiano. Además una vez introducido en el laboratorio no pudo preservar ningún alimento. Al microscopio vio dos formas de microorganismos, dedujo que una era sensible al calor y la otra termorresistente (estado de reposo que en determinadas condiciones da la otra forma). Para esterilizarlo creó la *Tindalización* este proceso consiste en calentamientos discontinuos (5' a 100°C (Ebullición)), un día de reposo y otra vez calor y así sucesivamente. En el tiempo de reposo las formas resistentes pasan a sensibles al calor.

Por fin se desechó la generación espontánea.

Actualmente se piensa que la generación espontánea se dio al surgir la tierra formándose materia orgánica a partir de materia inorgánica.

\* **3.-** Descubrimientos de la implicación en la transformación de la materia orgánica. Procesos: (Se observó relación entre crecimiento de microorganismos y alteración química del medio).

.- Putrefacción: Animal → Sustancias malolientes..

.- Fermentación: Materia vegetal → ácidos orgánicos y alcoholes.

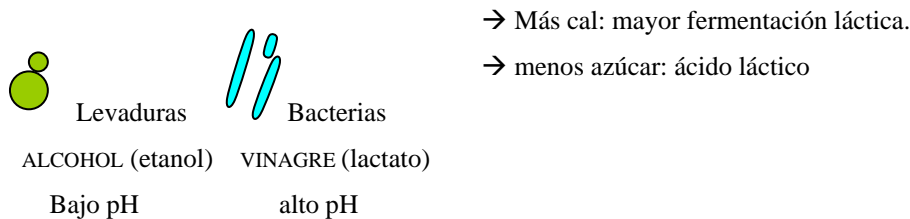
Algunos pensaban que eran procesos biológicos y otros químicos.

- Schwann/Cermord-Lateur (1850) relacionaron el crecimiento del hongo del azúcar y la fermentación alcohólica, los microorganismos están asociados a la transformación de azúcar en alcohol y CO<sub>2</sub>.

- **Liebi Barzelius /Whöler** no creían lo anterior y dicen que la fermentación y putrefacción son procesos únicamente químicos. Whöler sintetiza la urea y dice que es posible sintetizarlo todo sin seres vivos. Se aceptan las ideas de este grupo.

Pasteur demostró que el proceso de fermentación iba asociado a microorganismos, para ello estudió a los destiladores del sur de Francia (en Lille), a partir de remolacha en lugar de alcohol obtenían ácido láctico. Era debido a que en lugar de levaduras había

bacterias. Si sembraba por separado en un matraz uno daba alcohol y los otros daban ácido.



Si añadía tiza el pH del medio subía y se favorecía la producción de ácido láctico. Si se bajaba el pH se favorecía la producción de alcohol.

Pasteur descubrió que existían microorganismos anaeróbicos, para comprobarlo usó la fermentación butírica. En medio ácido con bajo pH los microorganismos realizaban la fermentación alcohólica mientras que con medio neutro a pH aproximadamente 7 los microorganismos realizaban la fermentación láctica.

.- Los hermanos **Buchner** (1897) comprobaron que no era necesario la presencia de microorganismos vivos intactos para fermentar, extractos de levadura también producían alcohol. Por tanto son moléculas presentes en esa célula (enzimas celulares) los que producen la reacción. (Inicio de la bioquímica).

.- Pasteur, estudiando la fermentación butírica, ve que en una gota de líquido (que además olía mal) las bacterias de los extremos están quietas mientras que las del interior se movían. Descubre la vida en ausencia del O<sub>2</sub>, vida anaeróbica y por tanto la fermentación anaeróbica, (toda fermentación es anaeróbica).

\* 4.- Cuando la tecnología permitió obtener cultivos puros.

Hacia 1890 no se podía ampliar el conocimiento sobre las fermentaciones, la demostración de la especificidad con cada microorganismo necesitaba del desarrollo de metodologías de cultivos puros.

Si inoculamos una solución nutritiva con microorganismos del suelo nos van a crecer un tipo concreto que usa lo que le da el medio de cultivo, cuando ese medio se agota desaparece y aparece otro que toma los desechos del primero, este descubrimiento hizo pensar que los microorganismos cambiaban de forma. Esto era lo que se pensaba al principio y a esta teoría se la llamó TEORÍA PLEOMORFICA, Pero otros como Pasteur y Koch decían que el organismo era constante (TEORÍA MONOMORFICA).

.- **R. Koch** (médico) en 1881 obtuvo cultivos puros de microorganismos, al principio usaba la patata, pero no era un medio rico para el crecimiento de los microorganismos, pero lo consiguió obteniendo previamente medios sólidos para lo que añadió una sustancia solidificante a los líquidos, probó con **gelatina**, pero ésta se volvía líquida con la acción de los microorganismos, además de que ciertas bacterias se la comían y los patógenos no crecían bien ya que estos tienen su óptimo a 36/37°C y la gelatina se diluía a los 25°C. Usó entonces el **AGAR**, que es un polisacárido de un alga marina que se funde a los 100°C y se solidifica a los 44°C, además pocas bacterias lo usan para alimentarse. Con éste obtenía colonias aisladas mientras que al sembrar en medio líquido sólo obtenía microorganismos. Obtuvo cultivos puros. Así aisló el bacilo de la tuberculosis.

.- **Brefeld y Bary** trabajando con hongos también consiguieron cultivos puros. Mezclan gelatina con el cultivo ya que al enfriarse se solidificaba y separaba las células (esto no sirve para las bacterias).

.- **J. Lister** usó el método de las diluciones seriadas para el aislamiento de los microorganismos. Se aísla siempre el más abundante.

\* **5.-** No se sabía si los microorganismos producían enfermedades. Pasteur dijo que eran agentes etiológicos. Habló de las enfermedades del vino y de la cerveza, relaciona microorganismo con enfermedad.

.- Tres investigadores trabajan con hongos y descubren enfermedades asociadas a los hongos: **Berkeley** (en la patata), **Bassi** (en gusanos de seda) y **Schönlein** (ve micosis superficiales en el hombre).

.- Lister en 1864 introdujo indirectamente la opinión de Pasteur al usar la antisepsia quirúrgica. Redujo las infecciones postoperatorias.

.- Koch en 1876 dio la causa directa al aislar el agente productor del Carbunco, que es la bacteria *Bacillus anthracis* (bacteria esporulada asociada a animales), que puede ser transmitida al hombre (y que no tiene nada que ver con el antrax, que lo produce *Staphylococcus aureus*).

En la sangre de los animales enfermos existían microorganismos, Koch inoculó con esta sangre a un ratón comprobando que desarrollaba la enfermedad, con la del ratón inoculó un medio de cultivo aislando colonias de los microorganismos, sembró en medios de cultivos hasta 8 veces, con una de las colonias inoculó en otro ratón

comprobando que desarrollaba la enfermedad. Comprobó que el agente era la causa de la enfermedad.

Postulados de Koch:

- 1.- El microorganismo debe estar presente en todos los casos de enfermedad.
- 2.- El microorganismo debe poder ser aislado en cultivo puro a partir de un hospedador enfermo.
- 3.- Al inocular el microorganismo en un animal sano produce la enfermedad.
- 4.- El microorganismo ha de poder aislarse a partir del nuevo animal y tiene que ser idéntico al original.

En los últimos 25 años del S.XIX se consiguió identificar a casi todos los microorganismos patógenos gracias a las escuelas de Koch en Berlín y de Pasteur en París, Pasteur se asocia con el médico **Joubert** y analiza paralelamente el Carbunco sin conocer los trabajos de Koch.

\* **6.-** Los virus fueron descubiertos por **Ivanowski** en 1892 gracias al mosaico del tabaco. Esta enfermedad la produce un agente filtrable, pasaban los filtros que retenían a las bacterias. Estos agentes afectaban a plantas, pero también podían afectar a animales y otros microorganismos.

- **Stanley** en 1935 cristalizó el agente responsable del mosaico del tabaco y sólo tenía RNA y proteínas.

- En 1971 descubrieron los Viroides (**Diener**) y en 1981 **Prunier** descubre los Priones.

\* **7.-** Los microorganismos como agentes geoquímicos.

La mayoría de los microorganismos son de vida libre y no causan daño a los seres superiores y son importantes en el reciclaje de materia en la tierra.

Los primeros estudios se dan en 1889, (**Winogradky**) se vio que existían unas bacterias quimiolitótrofas que crecían únicamente con compuestos inorgánicos y vio que eran grupos fisiológicamente diferentes y cada uno usaba ciertos compuestos (obtienen la energía de la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos y usan como fuente de carbono el CO<sub>2</sub>).

En 1901 idearon los cultivos de enriquecimiento, (por **Winogradky** y **Beijerinck**) se basaban en la falta de un nutriente favoreciendo el crecimiento de microorganismos que no lo necesitaban, se descubrió la existencia de bacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico, por Winogradky/Beijerinck ningún otro ser vivo es capaz de



usar ere nitrógeno. Si no fuera por estos microorganismos se agotarían las fuentes de nitrógeno para el resto de los seres vivos.

\* **8.-** Inmunología:

Pasteur desarrolló esta rama de la microbiología con ciertos experimentos:

- 1.- { Gallina A + cólera aviar → Mueren.  
Gallina B + cólera aviar viejo → Viven.
- 2.- { Gallinas B (del Exp. 1)+ cólera aviar → Viven.  
Gallinas A + cólera aviar → Mueren.

Las gallinas B inoculadas con un cultivo viejo de cólera aviar se han inmunizado frente al microorganismo, después en el contacto con un cultivo joven no desarrollan la enfermedad.

\* **9.-** Virología

Ivanowsky /Beijerinck descubrieron los virus, el THV o virus del mosaico del tabaco. Son partículas filtrables que atraviesan los filtros bacterianos. Son agentes infecciosos que no atienden a la metodología de las bacterias.

### DESARROLLO MICROBIOLÓGICO EN EL SIGLO XX

(pág. 26 Brock)

Se profundizó en fisiología, bioquímica y genética bacteriana. Gracias a estos estudios se alcanzó el desarrollo de la microbiología molecular. Todo condujo a que en los años 70 se desarrollara la tecnología del DNA recombinante (creación de nuevo DNA), esto abre el campo a la biotecnología.

Pero hasta entonces existen diversos pasos:

.- En 1941 se hallaron mutantes bioquímicos de un hongo, en cada uno faltaba una enzima. Se unen genética y microbiología al usar *Neurospora* para unir las rutas bioquímicas con procesos orgánico (**Tatum** y **Beadle**).

- .- En 1943 análisis de la mutación bacteriana. **Luria** y **Delbruck** usan fagos para estudios genéticos.
- .- En 1944 transformación bacteriana. Mediada por DNA, naturaleza química del material genético. **Avery, McLeod** y **McCarthy** descubren el principio transformante, el DNA, en la bacteria *Streptococcus pneumoniae*.
- .- 1950 estructura del DNA. **Watson** y **Crick**
- .- 1960 código genético.
- .- 1970 tecnología del DNA recombinante, permite fabricar microorganismos recombinantes, clonar, etc.
- .- 1980 revolución evolutiva.

La microbiología a avanzado en:

- .- Microbiología médica (curación de enfermedades).
- .- Microbiología agrícola (fijación del nitrógeno, plantas transgénicas...)
- .- Microbiología industrial (ácidos y alcoholes).

En España:

- .- Ramón y Cajal avanzó algo en microbiología.
- .- Ferrán fue el padre de la microbiología española, desarrolló una vacuna contra el cólera.
- .- Rodríguez Villanueva también fue un micólogo importante.
- .- Ricardo Guerreño es de la escuela de ecología microbiana.

**TEMA 2.- LOS MICROORGANISMOS EN LA ESCALA BIOLÓGICA.****INTRODUCCIÓN**

Según la teoría celular la célula es la unidad fundamental del ser vivo. Se llegó a la conclusión:

- .- Todos los seres vivos tienen una composición química común, con un flujo informativo DNA → RNA → Proteínas.
- .- Todas las células tienen un sistema enzimático que les permite llegar a cabo respuestas metabólicas, (rutas catabólicas y anabólicas).
- .- Las células surgen de células preexistentes por división celular.

**PROPIEDADES DE LOS SERES VIVOS**

- 1.- Nutrición, toman sustancias del ambiente y las emplean para obtener energía, biosíntesis y deshecho.
- 2.- Autorreplicación.
- 3.- Diferenciación celular, en algún momento cambian de forma y función. (bacterias → esporas). Transformación de estructuras que requiere un abanico genético.
- 4.- Circuitos de señalización química, ya que interactúan con el ambiente. Esto es total en pluricelulares. Comunicación.
- 5.- Evolución por cambios al azar, siendo filtrados por la selección natural, (mutación y selección).

**MODELOS DE ORGANIZACIÓN CELULAR.**

- 1.- Unicelulares.
- 2.- Multicelulares {
  - Células indiferenciadas
  - Células diferenciadas → Tejidos → Órganos
- 3.- Cenocítica. (Un citoplasma plurinucleado aumenta de tamaño sin división celular, pasa en hongos y algunas algas).

## SITUACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS A LO LARGO DE LA HISTORIA.

La tierra surgió hace 4000-4500 millones de años a una alta temperatura. Por radiología se sabe que las rocas más antiguas son de 3800 millones de años, son rocas: sedimentarias, volcánicas o carbonatadas.

Las más importantes son las rocas sedimentarias porque prueban que existía agua líquida lo que favorecía la existencia de seres vivos.

Estudiando en Australia las formaciones rocosa se han descubierto rocas de hace 3500-3000 millones de años. *Warrawoona*. Y en Sudáfrica se han visto otras formaciones llamadas *Swaziland*, donde se aprecia fósiles. Así pues existía microorganismos. Estos microfósiles recuerdan a las bacterias verdes y púrpuras filamentosas actuales. Estas formaciones recuerdan a los estomatolitos actuales que son capas de células dispuestas unas sobre otras.

Cuando se descubrieron sólo existían dos reinos: el **Animalia** (animales móviles) y reino **Plantae** (inmóviles y fotosintetizadores).

Hace 3000 millones de años surgieron los **organismos procariotas**. Con el tiempo aparecieron los eucariotas. Los primeros se datan en 1500 millones de años.

Antes de la aparición de procariotas hubo una evolución prebiótica que supuso: la formación de moléculas orgánicas, monómeros y luego polímeros por pérdida de moléculas de agua. Esta condensación se dio sobre las arcillas o piritas existentes. Se condensan los monómeros y dan las macromoléculas que se engloban por vesículas y empieza un metabolismo muy primitivo.

Los primeros procariotas eran heterótrofos, comían compuestos orgánicos.

Posteriormente aparecen los pigmentos fotosintéticos y con ellos los fotosintetizadores que son autótrofos anoxigénicos ya que no existía oxígeno. Cuando aparece el oxígeno debido a estos últimos organismos aparecen también los autótrofos oxigénicos.

En 1859 **Darwin** habla de posibles formas intermedias esperadas por la evolución.

En 1866 **Haekel** propone la creación de un reino para los microorganismos ya que los había móviles y con fotosintetización y no podían estar en ninguno de los otros dos reinos, a ese nuevo reino se le llamo reino **Protista**, son organismos con organización simple y sin tejidos.

A lo largo del S. XX se vio que las células eran Eucariotas y Procariotas. Se propusieron 5 reinos:

- .- Reino Animalia. → Organización Eucariota.
  - .- Reino Plantae. → Organización Eucariota.
  - .- Reino Protista . → Organización Eucariota.
  - .- Reino Fungi. → Organización Eucariota.
  - .- Reino Procariota → Organización Procariota.
- } Microorganismos.

Elementos	Procariota	Eucariota
Esteroles en membrana	NO	SÍ
Ribosomas	70S	80S
Núcleo con membrana	NO	SÍ
Flagelos	Hélice de flagelina	9x2+2 (del centriolo)
Cromosomas	Uno	Más de uno
Recombinación	Se forma un diploide parcial	Fusión de gametos
Pared celular	Sensibles a penicilina	No sensibles
Antibióticos	Penicilina, Aminoglicósido, Tetraciclinas, Cloranfenicol	Cicloheximida, Polienos.

### ¿CÓMO SURGIERON?

Se encontraron restos de fósiles eucariotas multicelulares que datan de hace 700 millones de años, sus mitocondrias y cloroplastos tiene ADN propio, los ribosomas son 70S y poseen un tamaño semejante al de las bacterias.

El núcleo ha surgido por autofagia de la región nuclear del procariota, pero no explica datos de la diferencia de la replicación, transcripción y traducción del DNA, esto significa que la célula que aportó el núcleo debía ser diferente.

**Teoría endosimbiótica:** Una célula engulle a otra, y ésta da lugar al núcleo con el material del huésped, mientras que el suyo se pierde.

En 1920 se estudiaron los microfósiles, como huellas de bacterias, composición y la presencia de células en división.

La RUBISCO incorpora mejor el C<sup>12</sup>, por ello los microfósiles que eran ricos en este isótopo tienen su alrededor carbonatado rico en C<sup>13</sup>. (Ello no es indicativo de que fotosintetizaran).

En rocas más modernas, de hace unos 2000 millones de años, vemos mayor diversidad de procariotas, nos informa de una alta tasa de evolución.

Tenemos un largo periodo de evolución celular, precedido de un corto periodo de evolución prebiótica.

Los fósiles no dicen nada pero la célula puede encerrar las claves de su pasado y lo vemos secuenciado en su DNA. Tenemos información.

Los métodos tridimensionales permiten comparar y dar juicios objetivos basados en relaciones matemáticas. Da más información de las relaciones evolutivas que los fósiles, ya que analizamos las moléculas sobre las que actúa la evolución.

Estudiamos los **relojes evolutivos**, son moléculas cuya secuencia cambia al azar y a una velocidad constante, no sometidos a los cambios de presión de la selección:

- 1.- Están universalmente distribuidos. Están en todos los seres vivos.
- 2.- Son homólogos funcionales en todos, es decir, cumple igual función en todos los seres vivos estudiados.
- 3.- Son comparables, tiene una determinada secuencia.
- 4.- Tienen una velocidad de cambio medible, ni muy lenta ni muy rápida.

Estas características las cumplen los ácidos nucleicos (RNA y DNA) y las proteínas. El uso de estas últimas era complicado y el DNA es muy estable por lo que se usa el RNA, más concretamente el RNAr ya que cumple todas las características anteriores. Existen diversos tipos de RNAr: 5S, 16S y 23S, el de 5S es muy pequeño y el de 23S muy grande por lo que se usa el de 16S.

C. Woese en 1990 estableció las relaciones filogenéticas, vio tres ramas independientes y dos de ellas eran procariotas:

Dominio Bacteria → <i>Eubacterias</i> .	}	Procariotas
Dominio Archaea → <i>Arqueobacterias</i> .		
Dominio Eukarya → <i>Eucariotas</i> .		

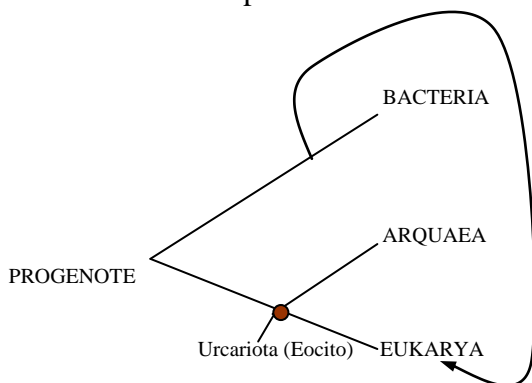
Para estas relaciones filogenéticas Woese analizó el RNAr 16S y comparó las secuencias de distintos organismos, el RNAr se retrotranscribe por la transcriptasa reversa a DNA monocatenario que es fácilmente secuenciable y así conocemos la secuencia. Con eucariotas se usó el RNAr 18S. Estas moléculas se usan como relojes evolutivos, a mayor diferencia entre las dos moléculas mayor distancia evolutiva existe. Se usó esta molécula por:

- .- Es universal.
- .- Tienen función constante a lo largo de la evolución.

- .- Es fácilmente alineable con otras moléculas de otros organismos.
- .- Es una molécula altamente conservada, es decir, tiene una tasa de cambio muy limitada.
- .- Es fácil de secuenciar.

Con esto se ha elaborado distancias evolutivas analizando datos con el ordenador. Dando árboles filogenéticos.

Partiendo de un **progenote** (la célula más primitiva) surgen dos líneas una de *bacterias* (sin núcleo precariótica o anucleada) y otra de *organismos nucleados*. Ésta última línea en determinado momento se divide en 2 ramas: surgen arqueobacterias y eucariotas. A este punto se le llamó **urcariota** o **eocito**:



Las arqueobacterias son los organismos menos Evolucionados. Las ramas más cortas en el árbol Dan una menor evolución.  
Los eucariotas son los organ. más evolucionados

El cloroplasto y la mitocondria eran bacterias que perdieron su autonomía. Hay dos tipos de eucariotas:

- .- Diplomonados
- .- Microsporidia.

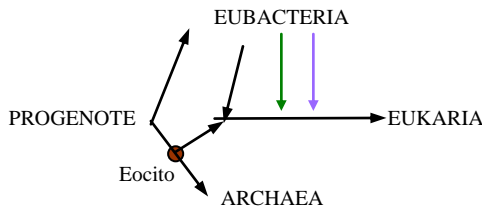
Existen eucariotas sin mitocondrias que no fagocitaron nada (Ej. *Giardia*).

Pese a ser eucariotas (tienen núcleo) no poseen mitocondrias y uno de sus RNAr es 16S y no tienen el RNAr 5.8S típico de eucariotas. Estarían próximos a los primeros eucariontes.

Este esquema cambia recientemente debido a nuevos datos aportados por el mejor conocimiento de una arqueobacteria que es totalmente secuenciada. La nueva filogenia se basa en análisis de proteínas además del análisis del material genético. Se han estudiado factores de elongación que están relacionados con la síntesis de proteínas. Se ha visto que los eucariotas, en cuanto a proteínas citoplasmáticas, se parecen a una bacteria Gram-, en cuanto al genoma, se parecen más a una Gram- y a arqueobacterias.

Parece existir fusión entre eubacterias y arqueobacterias para dar eucariotas, (similitudes y diferencias en la tabla).

Así, del progenote surgen 2 ramas, una de eubacterias y otra de arqueobacterias. En un momento determinado una arqueobacteria llamada eocito se hace simbiótico con una bacteria Gram- y da una línea nucleada que da a Eukarya, sobre ésta entra una cianobacteria dando el cloroplasto y una bacteria que dará la mitocondria.



Tras engullir al eocito y con el tiempo se pierde la membrana de la arqueobacteria y queda el material genético, la bacteria también entra y al final queda una célula con un genoma mixto de eubacteria y arqueobacteria que actualmente es la célula eucariota, el citoplasma sería bacteriano.

Evolutivamente entra primero la mitocondria (flecha verde) y posteriormente el cloroplasto (flecha azul).

	BACTERIA	ARCHAEA	EUCARIA
Estructura procariota	SÍ	SÍ	NO
DNAccc	SÍ	SÍ	NO
Núcleo con membrana	NO	NO	SÍ
Nucleosomas	NO	SÍ	SÍ
Pared celular	Ácido murámico	Ausente	Ausente
Lípidos de membrana	Ésteres	Éteres	Éteres
Ribosomas	70S	70S	80S
RNA iniciador	Formil metionina	Metionina	Metionina
Sensibilidad		Toxina diftérica (reacciona con el factor de elongación EF2)	Toxina diftérica
RNA polimerasa	Una	Varias (8-12 subuni.)	Tres (12-14 subuni.)
Rintamicina (inhibe elong.)	SÍ	NO	NO
Polimerasas	I,II,II	Una (homóloga de $\delta$ )	$\alpha, \beta, \Sigma$



Un grupo se diferencia de otro gracias a unas secuencias denominadas **secuencias señal** o **secuencias firma** en el RNAr. Son nucleótidos en determinadas posiciones que identifican al grupo.

### SECUENCIACIÓN DE GENOMAS

Comparamos secuencias de proteínas, vemos un árbol que dice que los eucariotas se parecen más a las bacterias. Depende de lo que se estudie tendremos distintos resultados.

2 genes: Informativos: derivan de Archaea, transmisión de forma clonal, transcripción, transacción.

Operacionales: Encargados del metabolismo, vienen de eubacterias de forma clonal y horizontal.

Eucariotas: fue la quimera de ambas. Surgió por:

.- Fagocitosis

.- Simbiosis entre proteobacterias fermentativas, y una archaea metanogénica que toma  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ . Finalmente se fundieron en una única célula.

Horizontal: Transmisión durante largo tiempo, son genes del metabolismo semejantes, importantes en la continua evolución de los organismos, iba admitiendo un genoma diferente hasta un momento que ya no era así.

**TEMA 3.- OBSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.****TÉCNICAS DE OBSERVACIÓN.**

El microscopio amplifica las señales y las recoge el ojo o las cámaras. Los objetos pueden ser luminosos o no luminosos que reflejen la luz.

La refracción es un cambio en la trayectoria de la luz cuando los objetos poseen distinta densidad.

Cuando la luz pasa de un medio a otro de diferente densidad cambia la trayectoria del haz. Cuando pasa de mayor a menor se aleja de la vertical y de menor a mayor se acerca.

A mayor densidad la luz disminuye de velocidad y se desfasa de onda.

La lente es un disco de vidrio con una o ambas superficies curvadas. Todos los rayos convergen en un punto que es el foco. La *distancia focal* es aquella distancia que existe entre lente y foco, y depende de la curvatura de la lente. En el foco se forma la imagen. Si el objeto lo ponemos en el foco la imagen se forma en el infinito.

Al poner un objeto a una distancia del foco, la imagen se forma en el foco conjugado (a la distancia adecuada del foco conjugado). Por cada punto del objeto se forma puntos en  $p'$  que dan la imagen invertida y su tamaño depende de la distancia del objeto a la lente. Si la imagen se forma a la misma distancia de la lente son iguales. Si el objeto se coloca lejos de la lente la imagen es más pequeña y si la ponemos más cerca de la lente la imagen es mayor, más grande. Cuando el objeto se coloca dentro de la distancia focal, los rayos divergen, se forma una imagen virtual no invertida, sólo se observa si recogemos los rayos y enfocamos en otro punto.

**OJO HUMANO.**

El ojo humano es una lente, tiene córnea, iris, cristalino (que es la lente) y la retina.

La imagen que se forma en la retina es invertida. Como sólo hay un punto donde se forma la imagen hay que enfocar en el mismo punto para ello está el cristalino que acomoda la curvatura. Pero hay un límite: a menos de 25 cm ya no se puede enfocar.

El tamaño depende de lo cerca que esté el ojo. Cuanto más lejos esté el objeto más pequeño se ve. A 25 cm podemos distinguir objetos de 0.1-0.2mm, (límite de

resolución), personas que ven muy bien, ya que se obtiene un ángulo de  $0.02^\circ$  que llega sólo a una célula.

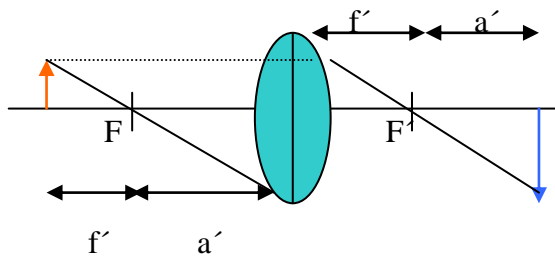
### MICROSCOPIA ÓPTICA.

Tenemos microscopía simple o compuesta: la **simple** consiste en una lente con resolución entre 50-300 aumentos y la **compuesta** son dos lentes y con resolución de varios miles de aumentos.

Se trabaja con el ojo, con la luz visible de  $\lambda$  de 400-700nm. Puede ser:

- .- M. de fondo o campo claro.
- .- M. de fondo oscuro.
- .- M. de contraste de fases.

#### 1.- Microscopio simple.



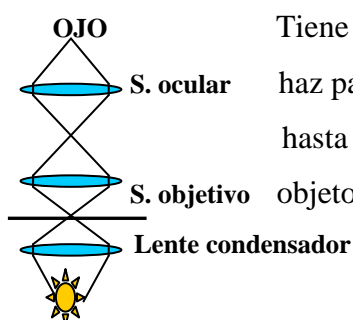
Amplifica el ángulo de  $0.02^\circ$  como si se pudiese acercar más de 25cm y enfocararlo.

Ej. A 2.5 cm de distancia quedaría amplificado 10 veces. Se usa una lente para que el objeto quede dentro de la distancia focal. El microscopio simple es una lupa. Da unos 300 aumentos.

El truco es colocar la imagen dentro de la distancia focal, el cristalino las recoge y ya no son divergentes, sino convergentes y se recoge en la retina.

El poder de amplificación de la lente es  $250\text{mm}/\text{distancia focal}$ , las mejores distancias focales son de 0.8mm. 300x es la mayor amplificación posible del microscopio simple o lupa. Este es el microscopio de Leeuwenhoek.

#### 2.- Microscopio compuesto



Tiene varias lentes. Primero una lente condensadora. El haz pasa por la lente o sistema de lentes condensadoras hasta el objeto. El sistema objetivo es la primera lente tras el objeto dando una imagen real invertida y aumentada de forma

considerable, esta imagen se forma dentro de la distancia focal del sistema ocular. Este ocular actúa como la lupa, los rayos que divergen al salir los recoge el cristalino.

El aumento del microscopio complejo se calcula multiplicando el aumento de la primera lente por el de la segunda.

Existen aberraciones que pueden ser esféricas cuando las lentes no están bien talladas o cromáticas en las que vemos irisaciones, no se diferencian bien los colores.

El **poder de resolución** es la capacidad para distinguir dos puntos separados entre sí. Las lentes enfocan un punto como un disco. El diámetro del objeto más pequeño que se puede ver es igual a:

Ec. de Abbé

$$\lambda / 2AN = \lambda / 2N\text{sen}\alpha.$$

AN → Apertura numérica (intrínseca a cada microscopio).

$\alpha$  → Semiángulo del cono de luz que forma el objeto con la lente objetivo.

N → Índice de refracción entre el medio y el objetivo.

En el caso del aire n es 1.  $\alpha$  es 58° en los mejores microscopios. ( $\text{sen}\alpha = 0.85$ )

Hay sustancias que mejorarían estos datos con mayor índice de refracción y por tanto menor diámetro del objeto. Por ejemplo el aceite de cedro (aceite de inmersión) tiene un  $n = 1.52$ .

### **TIPOS DE MICROSCOPIA**

La microscopía óptica se realiza a una longitud de onda de 400-700nm (luz visible).

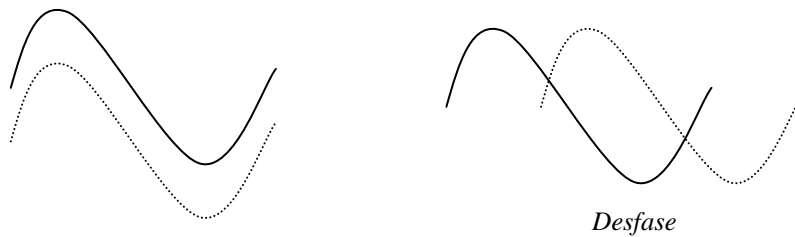
.- **MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO:** Su poder de resolución aumenta con el aceite de inmersión, se usan para ver bacterias.

Contraste: Absorbe parte de la luz y por otra parte lo difracta. En las muestras biológicas absorben en el ultravioleta, sólo algunas estructuras pigmentadas absorben en el visible. Para ver el contraste se acude a la tinción.

.- **MICROSCOPIA DE CAMPO OSCURO:** Tiene condensadores especiales, efecto Tyndall (dispersión de la luz). La luz pasa por la periferia del objetivo excepto los rayos difractados por la materia viva al desviarse de su camino normal, se ve todo negro excepto las manchas blancas de la sustancia.



.- **MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES:** La luz es una radiación electromagnética que se transmite en forma de ondas. Están en fase dos rayos cuando las ondas se superponen a lo largo del tiempo. La velocidad de la luz en un objeto es inversa al índice de refracción del objeto. Hay un desfase de rayos, y este microscopio hace perceptible esto, resalta unos objetos respecto a otros dependiendo del desfase. Da una imagen oscura en un fondo brillante



Cuando el haz incide en la muestra, dependiendo del índice de refracción, se produce una modificación de la velocidad de los haces luminosos que inciden. El hecho de que se modifique la velocidad hace que los haces estén en diferente fase. Estos microscopios aumentan aún más las diferencias de fase aumentando el contraste. Podemos ver material vivo y darle contraste.

Al fenómeno por el que se modifican las fases se le llama **Interferencia**.

Tiene dos elementos con los que conseguir la interferencia:

- .- Un disco que modifica los rayos que inciden. Está con el condensador.
- .- una placa de base entre ocular y objetivo.

\* **Microscopio de NOMANSKY.**- Se llama microscopio de contraste de interferencia diferencial. Tiene dos prismas paralelos que da una imagen tridimensional al superar las dos imágenes diferentes. Aumenta el contraste por el fenómeno de interferencia.

.- **MICROSCOPIA ULTRAVIOLETA.** Con una longitud de onda de unos 200-300 nm, se disminuye por tanto el diámetro del objeto más pequeño. No atraviesa el vidrio por lo que se usan lentes de cuarzo. Este tipo de microscopía se ha ido transformando en una de fluorescencia, donde las sustancias emiten luz y por ello son perceptibles.

### FINALIDAD DE LA MICROSCOPIA.

- .-M. de campo claro → Muestras teñidas.
- .-M. de contraste de fase → Células vivas, células no tratadas, microorganismos móviles, división, etc.

.-M. de Nomansky → imágenes tridimensionales, se ven órganos internos.

.-M. de campo oscuro → Apéndices, prolongaciones superficiales exteriores, se ven objetos más pequeños.

### MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Es una modificación del ultravioleta. Se basa en la propiedad de los cuerpos fluorescentes para absorber la luz ultravioleta y emitir en forma de luz visible (fluorescencia).

Sólo el condensador tiene que ser de cuarzo. No necesita cámara fotográfica. Las muestras aparecen fluorescentes sobre fondo negro.

Existen en la naturaleza compuestos fluorescentes, aunque en otros casos se añade a la muestra un colorante fluorescente llamado *fluorocromo*.

Aplicación.- Inmunofluorescencia. Usa anticuerpos fluorescentes contra una proteína para determinar la situación o localización de dicha proteína.

### PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL MICROSCOPIO ÓPTICO

.- **En fresco:** Para ver el organismo vivo.

- Suspensión celular en medio acuoso. Se cubre con el cubreobjetos para que el plano de la muestra sea muy fino.



.- **Tinción:** Pasos básicos:

1.- Extensión de la muestra en el portaobjetos formando un frotis.

2.- Se fija el frotis por calor o por agentes químicos. Se evita la deformación de las células con el colorante.

3.- Aplicación del colorante. Suele ser un compuesto orgánico con un cromóforo que da el color. Dependiendo de la carga del cromóforo el colorante será:

- Básico (+)	{	Azul de metileno Cristal violeta Safranina	}	Para ácidos nucleicos y polisacáridos.
--------------	---	--	---	--

- Ácidos (-)  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Eosina} \\ \text{Rojo congo} \end{array} \right\}$  Se fijan a algunas proteínas.

- Neutros: Se mezcla ácido más básico. Cosinato de azul de metileno.

En algunos casos es necesario añadir un **mordiente** que se fija a las estructuras celulares y favorece la unión del colorante.

## TIPOS DE TINCIÓN.

**1.- Simple:** Aumenta el contraste de la muestra para ver agrupaciones celulares o la morfología externa. Pasos:

- a.- Extensión.
- b.- Fijación.
- c.- Colorante.
- d.- Lavado y secado.

**2.- Negativa:** Se tiñe el medio, el colorante no penetra porque tiene carga negativa. Las células no están coloreadas. La imagen es similar a las del campo oscuro, se usa para ver la morfología externa, apéndices, etc.

Pasos: Se usa un colorante sin afinidad a las células, es *nigrosina* o *tinta china*, forma una estructura coloidal con el medio y no se pegan a las células.

Las células no se tienen por qué fijar y así no hay distorsión en ellas. Se mezcla el colorante con la suspensión celular, se extiende y se deja secar. La imagen que da es similar a la del microscopio de campo oscuro.

**3.- Tinción diferencial:** Se usan para distinguir diferentes grupos bacterianos. Hay diferentes tipos:

◆ **Tinción de GRAM (Gram 1884).**- Clasifica las bacterias en Gram+ y Gram-

- Tinción 1ª: Se usa cristal violeta (Básica, +). Con este colorante se tiñen todas las células.

- Mordiente: Lugol (I<sub>2</sub>-IK). Forma un complejo con el cristal violeta dentro de la célula.
- Lavado: con etanol que es un agente decolorante. Las células GRAM+ no pierden coloración. Las GRAM- quedan incoloras.
- Tinción 2ª: Con colorante de contraste que es la safranina que tiñe las células incoloras.

**GRAM+** → Violetas. Pared gruesa que se deshidrata con etanol y no sale el complejo lugol-colorante. Son Bacilos, Cocos, etc.

**GRAM-** → Rojas. Pared más laxa, con mayor nº de lípidos, el tratamiento con alcohol desorganiza la pared y pierden el colorante. Más porosidad. Son Bacilos no esporulados.

Si a las GRAM+ se las trata con lisoenzima pierden la capa del polisacárido y se convierten en GRAM-.

◆ **Tinción ácido alcohol resistencia (Ziehl-Noelsen).**- Se usa para determinar la presencia de bacterias de los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia*. Se basa en la resistencia de estas bacterias a ser decoloradas con una mezcla ácido-alcohol, se debe a la alta concentración de lípidos de su pared, ácidos micólicos. Pasos:

- .- Tinción 1ª: con fucina (básica) en presencia de calor porque no tomarían el colorante.
- .- Lavado con agente decolorante: ácido alcohol. Si la prueba es positiva da color en caso contrario sale sin color.
- .- Tinción 2ª: con colorante de contraste como el azul de metileno.

Prueba positiva → Fucsia

Prueba negativa → Azul.

Se piensa que los ácidos micólicos forman una barrera lipídica que no deja salir el colorante.

### 3.- Tinciones especiales: Para ver estructuras específicas:

◆ **Tinción de cápsulas.**- Indicador de probable patogeneidad. La cápsula es una cubierta altamente hidratada, fija mas los colorantes. Se hace por los pasos siguientes:

- 1.- Tinción negativa seguido de tinción simple, fondo oscuro y célula con halo.
- 2.- Tinción simple con cristal violeta, se lava con sulfato cúprico, así se consigue que la célula aparezca teñida y alrededor de ella se ve un halo azul brillante debido al sulfato.



- ◆ **Tinción de endosporas.**- Formas de resistencia, con pared muy gruesa (de tinción difícil). Se tiñen por una tinción diferencial llamada *tinción de SHAFFER-FULTON*:
  - 1.- Tinción 1ª: con verde malaquita y calor.
  - 2.- Agua como agente decolorante, una vez que la endospora coge el colorante ya no lo suelta. Sólo queda teñida la endospora y la célula vegetativa está incolora.
  - 3.- Se usa safranina para teñir la célula, se ve la célula roja con la endospora verde dentro.
- ◆ **Tinción de flagelos.**- El diámetro de los flagelos es muy pequeño, < de 20 micras. Se añade un mordiente que se fija al flagelo y lo engrosa artificialmente. Posteriormente se hace una tinción simple con fucxina.

### **MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN.**

Posee una haz de electrones proyectado desde un cañón electrónico que incide sobre unas lentes electromagnéticas (electroimanes) que dirigen el haz de electrones a la muestra y es recogido en una pantalla fluorescente. Se ve esa imagen por un visor.

Tiene un elevado poder de resolución, de 1-0.5 nm. La longitud de onda de los electrones es de 0.04 nm (10000 veces inferior a la de la luz visible). Se pueden obtener límites de resolución inferiores a 1nm con aumentos de hasta 200000 veces.

#### **CARACTERÍSTICAS:**

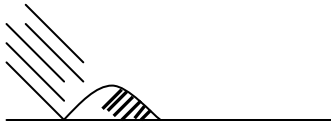
- .- Los electrones transmiten mal en el aire por eso debe ser una columna en vacío. La muestra debe estar deshidratada, en algunos casos se da alteración de las estructuras internas.
- .- Los electrones penetran débilmente por lo que no se puede ver una célula entera, sólo vemos secciones de célula.
- .- El contraste depende de la masa atómica del material a observar, dependiendo de ésta se da un grado diferente de dispersión de los electrones. Los elementos vivos tienen una masa menor, se tiñen con sales metales pesadas, Au, Pt, W, Pb, U, aumentando el contraste. Esta tinción puede ser positiva, se fija el metal a la célula, o negativa, se tiñe el medio. La tinción negativa permite ver partículas más pequeñas y se usa en el estudio de virus o proteínas, ácidos nucleicos, macromoléculas.

**Preparación de la muestra:**

.- Deshidratación de las muestras.- Se embeben en un material plástico que desplaza el agua (bloque sólido), resina.

.- Seccionado de las muestras con el ultramicrotomo, lo ideal es obtener secciones de menos de 10nm.

.- Tinción: *Sombreado metálico* (con oro o platino) lluvia oblicua de material pesado, al observarse da una idea tridimensional; *Réplica* para estudio de superficies opacas a los electrones, volátiles al vacío o inestables al bombardeo de los electrones, se recubre la muestra con un material transparente luego se disuelve la materia y obtenemos una réplica; *criofractura* y *criograbado* (con carbono) se congela la muestra, el material se corta por fractura siguiendo la línea de la materia.



**TEMA 4.- CULTIVO DE MICROORGANISMOS.**

Los microorganismos tienen distintas necesidades nutritivas, basadas en mecanismos de síntesis propios y rutas metabólicas.

Los fototrofos usan la luz mientras que los quimiotrofos usan compuestos químicos.

Los seres vivos pueden usar distintas fuentes para conseguir los elementos esenciales para su supervivencia. Las principales fuentes son las de carbono y energía pero también son necesarias otras para obtener nitrógeno, azufre, etc.

.- FUENTE DE CARBONO:

**CO<sub>2</sub>:** autotrofos

**Compuesto químico orgánico:** Heterotrofo.

Algunos poseen un metabolismo *obligado* o *facultativo*.

.- FUENTE DE ENERGÍA:

**Luz:** *autotrofos*.

**Compuestos químicos:** *Quimiotrofos*.

	<b>Fuente de energía</b>	<b>Fuente de carbono</b>
<b>Fotoautotrofo</b>	<i>Luz</i>	<i>CO<sub>2</sub></i>
<b>Quimioautotrofo</b>	<i>Compuesto químico</i>	<i>CO<sub>2</sub></i>
<b>Fotoheterotrofo</b>	<i>Luz</i>	<i>Compuesto orgánico</i>
<b>Quimioheterotrofo</b>	<i>Compuesto químico</i>	<i>Compuesto orgánico</i>

.- FUENTE DE NITRÓGENO:

Las plantas usan **nitratos**

Los animales usan **nitrógeno orgánico**.

Los microorganismos usan **nitrógeno por fijación, nitrógeno inorgánico y orgánico**.

.- FUENTE DE AZUFRE:

Las plantas usan **sulfatos**, (sales inorgánicas)

Los animales usan **proteínas**, (compuestos orgánicos)

Los microorganismos usan de todo, **inorgánico (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)**, **orgánico (aminoácido)**, **S<sup>0</sup>**, **etc.**

.- FUENTES DE FÓSFORO. En general son sales

.- FUENTE DE SALES MINERALES:

K, Ca, Mg, Fe, (mg/l) son **micronutrientes**.

Mo, Mn, Zn, Co, Ni, (µg/l) son **oligoelementos**.

.- FACTORES DE CRECIMIENTO:

Son aquellos elementos tales como las **vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas**. Si el organismo los necesita tomar del medio y no puede sintetizarlo hablamos de *auxotrofos*. Si por el contrario puede sintetizarlos hablamos de *prototrofos*.

Ejemplos:

El **ácido fólico** o PABA: transferencia de un carbono. (*L. casei*), sintetiza Timina, Purina, Metionina, Serina, Ácido patoteico.

**Biotina**: fijación del CO<sub>2</sub>.

**Ácido nicotínico**. *Hemophilic*

**Riboflavina**. FMN, FAD, (Dhasa, cadena de transporte de electrones)

**Ácido pantoténico**: es parte de la coenzima A.

**Tiamina** (TPP) descarboxilaciones, de las trascetolasas.

**B<sub>6</sub> o Piridoxina**: fosfato de piridoxal (síntesis y degradación de aminoácido) transaminasa y deaminasas.

**B<sub>12</sub>**: Sintetizado po microorganismos para la síntesis de desoxirribosa.

**Ácido lipoico**: Bacterias del ácido láctico.

**Co-M**: Producción de metano.

**Vitamina k**: Síntesis de esfingolípidos.

## CULTIVOS

Un cultivo es el crecimiento de poblaciones microbianas de forma controlada en un medio artificial. Un cultivo según su composición química puede ser:

- Sintéticos: Tiene una composición química definida. Cuanto más simple es mejor purificamos los productos de la bacteria.
- Complejos: su composición es no conocida, no sirve para purificar los compuestos pero en ellos puede crecer cualquier microorganismo. (Ej. caldo glucosado)

Según el estado físico del medio los cultivos pueden ser: Líquido, sólido, semisólido. Depende de si el agar es más o menos gelatinoso. El agar es un compuesto formado por agarosa que es un polímero de galactosa al 70% y de agarpectina al 30%.

Es sólido cuando existe el 1.5-2% de agar, semisólido (para estudios de movilidad) cuando la concentración es de 0.15-0.4% y es líquido cuando hay menos del 0.15% de agar.

### APLICACIONES:

- **Medios enriquecidos:** Añaden nutrientes a los cultivos donde el microorganismo exige mucho. (Ej. sangre para que crezca *Hemofilus*)
- **Medios selectivos:** Añaden compuestos al agar que permiten el crecimiento selectivo de los microorganismos. Ej. *Cristal violeta*: sólo crecen Gram-; *Maltosa*: Sólo crecen los que tengan la enzima maltasa; *Penicilina*: sólo crecen eucariotas; etc.)
- **Medios diferenciales:** Los microorganismos crecen de forma diferente, añadiendo al medio sustancias especiales (sangre). Se usa también viraje de colores. Ej. en *sangre* diferenciamos los organismos hemolíticos de los que no lo son; en *EMB* (eosina azul de metileno vemos los que aprovechan lactosa de los que no; medio *McConky* (rojo neutro); en sales de pb vemos los productores de SH<sub>2</sub> que dan un precipitado negro de lo que no lo producen.

Un ejemplo típico es el caldo común, que es glucosa más extracto de carne, y peptona, se ajusta el pH, se añade NaOH, tamponamos, filtramos, espesamos y por último esterilizamos.

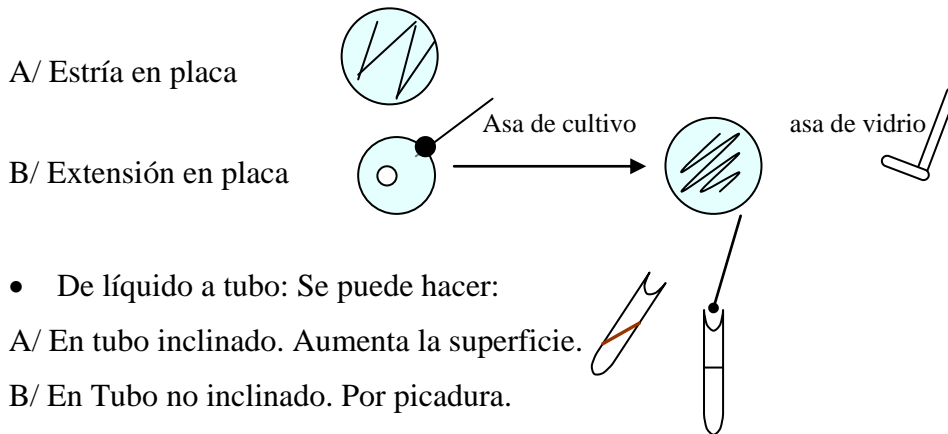
### SIEMBRA: TÉCNICAS E INSTRUMENTOS:

#### .- INSTRUMENTOS:

- Asa de siembra: picadura.
- Asa de vidrio.
- Pipeta Pasteur.

#### .- TÉCNICAS:

- De líquido a placa: Se puede hacer de dos formas:



- También se puede transferir a un cultivo puro.

### OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS

1. *Siembra en superficie*. Extensión y estría.
2. *Vertido en placa*. Mezclando los microorganismos con agar fundido a 44°C, y se echa luego sobre la placa. Los microorganismos crecen en la superficie y dentro
3. *Técnicas de enriquecimiento*. Aplicar el elemento adecuado (por ejemplo benzoato) al tubo de ensayo, se aíslan microorganismos que no se aíslan con los métodos anteriores y que están en pequeñas cantidades (como pueden ser aquellos que sólo usan benzoato). Se debe realizar varias veces para asegurarnos que tenemos un cultivo puro. (Otros ejemplos: elevada temperatura para termófilos; calentamiento a 80°C para esporulados y termófilos.)
4. *Dilución seriada*. Sólo aísló el microorganismo más abundante. (Lister con *Streptococcus lactis* hace diluciones, cada dilución la siembra en 20 tubos, cuando de un dilución sólo crece el 5% la probabilidad de que en ese tubo crezca 1 sólo tipo de microorganismo es del 4.8%, así estamos seguros de que sólo existe un tipo de microorganismo).
5. *Micromanipulador*: aislamos una sola célula utilizando este aparato.
6. *Aislamiento de microorganismos anaerobios*. Micromanipulados. Obtenemos los organismos anaerobios por una adición de agar a 44°C, mezclamos y tapamos con parafina (aceite estéril). Eliminamos el O<sub>2</sub> con agentes reductores (tioglicolato, añadimos un colorante REDOX para ver cuando se ha reducido), con una vela que consume el oxígeno, usamos la jarra de anaerobios (sistema que produce CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> y

un catalizador que consume O<sub>2</sub>). Cuanto más sensibles son más precauciones tenemos que tomar.



### CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS PUROS

- ◆ Las colonias deben ser iguales en forma, tamaño y color.
  - ◆ Que no existan formas inhibidas.
  - ◆ Al microscopio deben tener un aspecto común.
  - ◆ Tiene que tener iguales propiedades tintoriales.
  - ◆ Deben ser bioquímicamente y fisiológicamente iguales.
- .- Una regla importante es no coger nunca de la primera colonia.

### MANTENIMIENTO

- 1.- Debemos transferir periódicamente, ya que los tubos de agar se secan, se evapora el agua.
- 2.- Se debe cubrir con parafina, con lo cual la transferencia se puede hacer más tarde, disminuye el metabolismo y tardan en envejecer.
- 3.- Se disminuye la temperatura, congelamos las células. Para proteger las células y que no se formen cristales que las dañen se usa el glicerol
- 4.- La **liofilización** es la sublimación a alto vacío de las muestras congeladas con rapidez.

(<sup>1</sup>Nota)

---

<sup>1</sup> Para ejemplos de cultivos ojea página 19 apuntes de Sara

**TEMA 5.- ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN.****ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN.**

Tanto la esterilización como la desinfección son métodos para el control o eliminación de microorganismos, tanto en investigación como industria y sanidad.

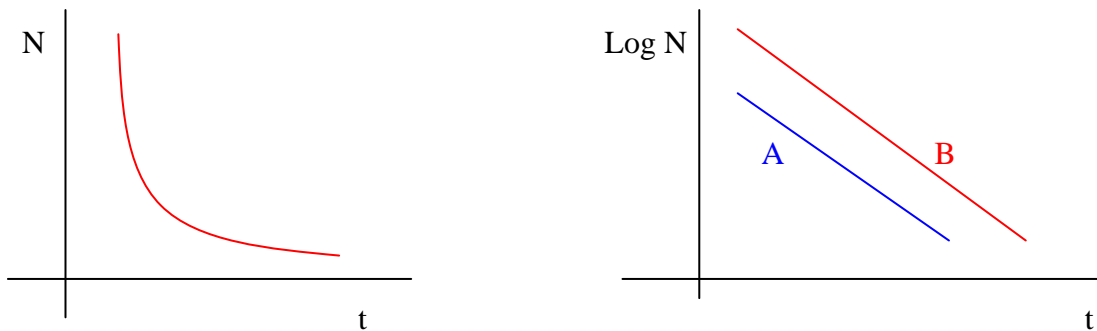
- .- Con la **Esterilización** se consigue eliminar toda forma microbiana.
- .- La **Desinfección** consigue eliminar sólo las formas vegetativas. No supone eliminación de formas de resistencia.
- .- La **Antisepsia** es un tipo de desinfección que se da sobre tejidos vivos.

El efecto de un agente antimicrobiano puede ser:

*Germicida* si muere el microorganismo de forma irreversible.

*Microbiostático* si se detiene el crecimiento de los microorganismos. Es reversible, cuando se elimina el agente el microorganismo sigue creciendo.

*Muerte* de microorganismos es la pérdida irreversible de la capacidad de reproducción.



(N → supervivientes de una población expuesta a un agente antimicrobiano).

La pendiente de la recta es la tasa de mortalidad de la población frente al agente.

$$\text{Tasa de mortalidad} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células muertas}}{\text{tiempo.}}$$

Hay que tener en cuenta el n° de células iniciales. La tasa de mortalidad es la misma para A y B pero necesitamos más tiempo para eliminar la población B.

Se quieren conseguir distintos efectos:

- .- Uno de los efectos que se quieren conseguir es dañar la pared celular, *lisis*. Esto da lugar a células llamadas protoplastos, que no soportan la presión osmótica del medio y se produce la lisis de las células.



- .- Actuando o dañando la permeabilidad de la membrana celular.
- .- Inhibiendo enzimas específicas.
- .- Desnaturalización de proteínas o ácidos nucleicos.

### **FACTORES QUE MODIFICAN LA ACCIÓN DE UN AGENTE**

Hay células más sensibles, dependiendo del tipo celular (célula vegetativa es más sensible que en forma de spora) y del estado fisiológico de las células (son más sensibles a agentes que atacan el metabolismo cuando están creciendo, las células viejas son más sensibles a aquellos agentes que atacan la membrana).

También depende de las condiciones ambientales:

- .- Ambientes ácidos dan mayor eficacia con un tratamiento por calor.
- .- A mayor concentración de hidratos de carbonos mayor resistencia térmica.
- .- A mayor concentración de materia orgánica, existe una mayor resistencia a agentes desinfectantes.

Existen determinados compuestos que pueden ser microbiostáticos a baja concentración y germicidas a una concentración mayor.

### **AGENTES ANTIMICROBIANOS FÍSICOS.**

#### ◆ **1.- TEMPERATURA-** (Calor seco o húmedo).

- .- *T óptima*: es la temperatura a la que se presenta la máxima tasa de crecimiento.
- .- *Límites de permisividad*:
 

{	T máx.: T > efecto letal
}	T mín.: T < detección crecimiento (microbiostático).
- .- *Punto térmico letal*: mínima T para matar una población en 10 min.
- .- *Tiempo térmico letal*: Tiempo mínimo para matar una población a una determinada T.
- .- *Reducción decimal del tiempo*: Tiempo necesario para matar el 90% de una población a una determinada T.

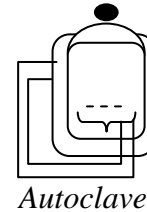
Nos encontramos los siguiente tratamientos:

**A.- Tratamiento por calor húmedo:** Desnaturaliza las macromoléculas. Es más efectivo que el seco. Es más rápido y necesita menos intensidad.

A.1.- Vapor a Presión (autoclave).- Cámara cerrada, se sustituye el aire por vapor de agua encerrado a presión. Se consiguen 2 atm. de presión, por ello se alcanzan T más elevadas, de hasta 120°C, a esta T se mantienen las muestras durante 15 min. Y se **esterilizan**. Para eliminar células vegetativas se necesita unos 70°C durante 10 min., para las esporas es necesario 120°C durante 5-10 min.

Se aplica en medios de cultivos y soluciones acuosas sobre todo.

No es adecuado para recipientes vacíos y grasas (no se mezclan con el agua), en estos compuestos no se alcanzarían los 120°C.



Autoclave

Tampoco es adecuado para vitaminas ya que se destruyen.

A.2.- Ebullición.- Sólo se produce la **desinfección**, no se matan las formas de resistencia.

A.3.- Tindalización.- También se conoce como esterilización seriada. Se **esteriliza** por calentamiento discontinuo, consiste en hervir durante un tiempo y dejar enfriar, esto se hace varias veces seguidas durante varios días.

100°C —————> 100°C —————> 100°C  
(5min) -- 1 día (5min) -- 1 día (5min)

Se esterilizan sustancias que no soportan más de 100°C.

A.4.- Pasteurización.- Se consigue **desinfección**. Sólo se aplica en alimentos como leches. Batidos, cremas, bebidas alcohólicas, etc. No se eliminan todas las formas de vida. Se eliminan los microorganismos patógenos, rebaja la población microbiana.

Al principio el tratamiento consistía en mantener durante 30' a 62°C. Actualmente se hace a 72°C y durante 5''.

En medio ácido (tomate) se mata mejor que en medio neutro (judías verdes)

En la leche se elimina: *Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnetii*, ambas en la leche.

La efectividad depende de la concentración de proteínas, a grandes concentraciones hay mayor resistencia a la temperatura.

### **B.- Tratamiento por calor seco.**

El calor seco oxida componentes celulares, deshidrata las células. Se usa para material de vidrio y aceites. Si se usa el horno Pasteur se alcanzan los 170°C.

**B.1.- Flameado.-** Se usa en asas de siembra que se pasan directamente por el mechero, también para matraces y tubos.

**B.2.- Incineración.-** Para material de deshecho hospitalario y para el asa de platino.

**B.3.- Esterilización por aire caliente en horno.-** Hornos normales, se introduce material de vidrio y se somete durante 2h. a temperaturas entre 160-170°C. Esteriliza materia de vidrio y aceites (horno Pasteur).

### **C.- Tratamiento por frío**

Son menos eficientes que los tratamientos por calor, dependen del organismo, su efecto es *bacteriostático*. La muerte se da por formación de cristales proteicos.

#### ◆ **2.- DESECACIÓN-**

Tiene un efecto *bacteriostático*. No elimina ni esporas ni virus. Algunos microorganismos patógenos son altamente sensibles. Se usa en conservación de frutos secos, carnes, etc. Al rehidratar volverían los microorganismos.

#### ◆ **3.- CAMBIOS DE PRESIÓN OSMÓTICA-**

Similar a la desecación. Cuando la presión osmótica es muy elevada la célula pierde agua y se da plasmolisis desecándose la célula.

Salazones → Se somete el alimento a concentraciones de sal del 10-15%

Mermeladas → La concentración de azúcar es del 50-70%.

Los hongos y las levaduras crecen en estos alimentos. Tienen mayor resistencia.

#### ◆ **4.- RADIACIONES-**

Se denominan también *esterilización fría*. Se usa con material sensible al calor, ya que no produce calentamiento del material. Puede ser:

1.- **Radiaciones electromagnéticas:** Luz UV, muta el DNA (dímeros de timina), la célula tiene un sistema de reparación en el cual con luz azul se activan las enzimas fotorreparadoras, también existe una reactivación en oscuridad. Tiene bajo poder de penetración, se usa en superficies o ambientes como quirófanos o plantas de envasados.

2.- **Radiaciones ionizantes:** Son rayos  $\beta$  y  $\gamma$ , que se producen por la salida de electrones de la molécula, se forman radicales libres que son muy reactivos ( $\text{OH}^\cdot$ ). Tienen mayor energía ya que la longitud de onda es menor. Provoca la ionización de moléculas sobre todo del agua produciendo formas de oxígenos que son grupos muy reactivos. Tienen

un elevado poder de penetración. Esto requiere altas medidas de seguridad. Se usa para esterilizar grandes volúmenes de alimentos o medicamentos. Por ejemplo, *Pseudomonas* muere rápidamente pero *Deinococcus radiodurans* aguanta mucho más porque tiene eficientes sistemas de reparación, a final todos los microorganismos mueren, pero unos tardan más que otros.

#### ◆ 5.- FILTRACIÓN-

Se usa para líquidos o gases altamente sensibles. Hace pasar líquidos o gases a través de placas porosas. Se usan con vitaminas, enzimas, suero, antibióticos, etc. Deja pasar los virus ya que son agentes filtrables. El diámetro del poro suele ser de unas  $0.2\mu\text{m} = 2 \cdot 10^{-7}\text{mm}$ , a menor tamaño de poro mayor número de microorganismos quedan en el filtro. Los filtros pueden estar hechos de policarbonatos, plásticos, acetato de celulosa, etc.

Para filtrar el aire se usan mascarillas (en quirófanos), tapones de algodón en los matraces. También se usa un instrumento que es la campana de flujo laminar.

### **AGENTES QUÍMICOS (antimicrobianos).**

Deben ser altamente tóxicos y volátiles. La mayoría sólo consiguen desinfección, no eliminan ni esporas ni virus. Pueden ser líquidos si el diluyente es  $\text{H}_2\text{O}$  se llaman *soluciones*, si es alcohol se llama *tinturas*. El mejor es el óxido de etileno que es gaseoso.

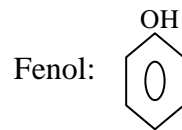
#### ◆ 1.- FENOL Y DERIVADOS (Cresoles).

Desnaturalizan proteínas provocando daños en la membrana. A baja concentración son microbiostáticos y a grandes concentraciones son germicidas. No son efectivos contra esporas y virus. Sin embargo son altamente activos aunque exista una alta concentración de materia orgánica, y además permanecen activos durante mucho tiempo.

El Fenol fue el primer agente químico usado. A elevadas concentraciones daña las membranas y precipita proteínas, a baja concentración inhibe o inactiva enzimas. Mata a *M. tuberculosis*. Lister lo usó en las operaciones quirúrgicas. Actualmente el fenol no se usa mucho, se usan más los cresoles que son menos irritantes y de mayor efectividad antimicrobiana, el más usado es el hexaclorofenol pero que se usa sólo en

casos concretos ya que puede causar daños al individuo, al 3% es inocuo, se lavan bebés.

El metil-resorcinol se usa como desinfectante y antiséptico (lavarse las manos, etc.).



## ♦ 2.- ALCOHOLES

Se usan los de cadena corta que son solubles en agua. El más usado es el ETANOL (en un 5-70%). Son agentes deshidratantes, desnaturalizan las proteínas y disuelven los lípidos de la membrana. También tienen un efecto de barrido, limpian sobre la piel grasas, células muertas, etc. Se usan con agua, no están al 100% para una mejor penetración en la célula.

Sólo **desinfecta**, no elimina las formas de resistencia.

También se usa pero menos el *isopropanol* y el *metanol*. Éste último no se usa porque no es un buen desinfectante, no mata a *M. tuberculosis*.

## ♦ 3.- HALÓGENOS (I<sub>2</sub>, Cl<sub>2</sub>, Br<sub>2</sub>)

**1.- Yodo.**- Es uno de los pocos que consigue la **esterilización**. Por una parte es agente oxidante y en ocasiones inactiva ciertas enzimas uniéndose a residuos de tirosina. No les afecta la presencia de materia orgánica. Se usa para quemaduras, piel, infecciones vaginales, etc. Se emplea tintura de yodo (I + H<sub>2</sub>O + CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH), éste puede irritar la piel y puede provocar alergias, ahora se usan iodóforos que son I + compuesto orgánico (el Betadine), éstos liberan el yodo en menor cantidad, más lentamente.

**2.- Cloro.**- Sólo es **desinfectante**. Produce radicales oxígeno muy reactivos al reaccionar con el agua. Inactiva ciertas enzimas uniéndose a ellos. No actúa sobre las formas de resistencia. Con materia orgánica los radicales se anulan y pierde efectividad. Se usa para:

- .- Gas comprimido para purificación de suministro de agua.
- .- Hipocloritos de sodio y calcio para lejía hogar e industria.
- .- Cloraminas. También para lejías, hogar e industrias. Sueltan el Célula más lentamente, duran más tiempo que el hipoclorito.

#### ◆ 4.- DETERGENTES

Sólo son **desinfectantes**, destruyen membranas. Son tensioactivos, es decir, disminuyen la tensión superficial y favorecen el arrastre por el agua, dan una función de barrido. Los jabones neutros son poco efectivos, ejercen un efecto mecánico sobre los microorganismos.

Su actividad disminuye con la materia orgánica. Y son inefectivos contra *M. tuberculosis*, con el virus de la hepatitis y con esporas.

Existen tres tipos: los no iónicos, los aniónicos y los catiónicos (sales de amonio cuaternario) que son los más usados. Los detergentes catiónicos (con carga positiva), alteran con su carga la carga externa de la célula modificando la permeabilidad de la célula. Son compuestos de amonio cuaternario (NH<sub>4</sub>), en los que los hidrógenos se sustituyen por cadenas de carbono. Uno de los más usados es el *cloruro de benzalconio*, al tener carga positiva interacciona con los microorganismos de carga negativa desorganizando la envuelta celular. Son desinfectantes de material médico, alimentación y antisepsia de la piel.

#### ◆ 5.- METALES

Ciertos metales pesados. Su acción se denomina oligodinámica, es decir son activos en muy bajas concentraciones (ppm). Inactiva específicamente enzimas claves al reaccionar con grupos SH. Son muy tóxicos y su actividad disminuye con la existencia de fluidos biológicos.

.- **Plata** → Nitrato de plata. **Antiséptico**. Lavan los ojos de recién nacidos, en casos concretos, para evitar la ceguera, se usa cuando la madre está infectada de *Neisseria gonorrea*.

.- **Mercurio** → Cloruro de mercurio. Éste elemento es altamente tóxico y es inefectivo con materia orgánica, pero afecta a muchos microorganismos. El mercurocromo es menos tóxico pero menos efectivo con materia orgánica.

.- **Cobre** → Sulfato de cobre. Se usa como alguicida en piscinas. Se adiciona a pinturas para evitar hongos.

.- **Zinc** → Cloruro de zinc en colutorios bucales. El óxido de zinc es antifúngico en pinturas.

En general ocasionan problemas medioambientales.

## ◆ 6.- ALDEHÍDOS

\* **Glutaraldehído:** en solución del 2%. Tiene dos grupos aldehído. Se puede ciclar. Un OH reacciona con una proteína y el otro con otra y las entrecruzan y matan los microorganismos. Se usa para fijar células, porque matan inmediatamente. Matan bien a *M. tuberculosis* y bacterias.

\* **Formaldehído:** Es un gas estable a alta temperatura y a determinada concentración. A temperatura ambiente es sólido porque polimeriza y da paraformaldehído o formol. Es irritante y tóxico. Esteriliza la campana de siembra y se espolvorea en áreas cerradas.

## ◆ 7.- ÁCIDOS Y ALCALIS

A pH extremos los microorganismos mueren. No es general, algunos microorganismos toleran pH muy extremos. Este método se usa para detectar *M. tuberculosis* al resistir pH básico (álcalis) el pH óptimo es de 7 aunque soporta un pH mayor por lo cual es diagnosticable.

Si es importante el uso de ácidos orgánicos en la preservación de alimentos:

- .- Ácido benzoico.- Refrescos, alimentos ácidos
- .- Ácido sórbico.- Quesos
- .- Propionato cálcico.- Pan

## ◆ 8.- AGENTES GASEOSOS

**Esterilizan.** Se usan en material sensible al calor y a la humedad. Se tiene que realizar en cámaras blindadas semejantes a autoclaves, son agentes alquilantes, (sustituyen radicales de H).

El más usado es el **óxido de etileno**. Tiene elevado poder de penetración, **esteriliza** elevados volúmenes. Es lento, tiene que estar mucho tiempo con la muestra. Se ha usado para esterilizar naves espaciales.

El *formaldehído* es de menor efectividad, un derivado suyo se usa más es el *formol*, preserva la materia orgánica.

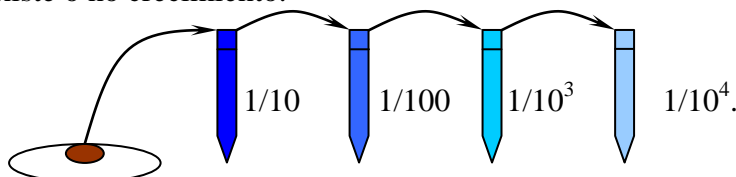
La *β-propiolactona* no es muy usada ya que pese a ser efectivo es carcinógeno.

**EVALUACIÓN DE UN DESINFECTANTE.**

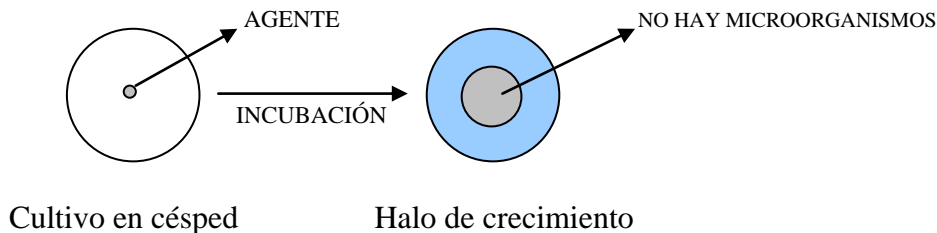
Se somete un microorganismo prueba frente a un agente que se quiere evaluar a diferentes concentraciones y diferentes tiempos.

Ej. *Staphylococcus aureus*. Se pone un nº concreto de células con diferente concentración del agente a distinto tiempo. Así se sabe a que concentración y durante cuanto tiempo se pasa a no tener colonias.

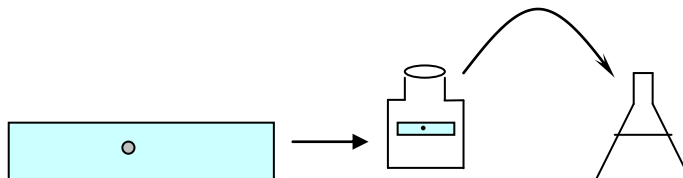
1.- Agentes líquidos: Se usan sucesivas diluciones del agente, tomamos muestras a distintos tiempos y luego se siembra cada muestra en un medio de cultivo y se observa si existe o no crecimiento.



2.- Agente sólido: Colocamos un trozo sobre una placa de Petri en la que hemos sembrado el microorganismo en césped.. según el tamaño del halo de inhibición del crecimiento vemos la toxicidad.



3.- Agente gaseoso: Sobre un papel estéril se coloca una gota del cultivo. Introducimos en un recipiente en presencia del gas y seguidamente se inocular a un medio de cultivo para ver el crecimiento.



.- **Índice de Fenol:** Es un método para comparar un agente con el fenol, se determina los efectos producidos a unas concentraciones y tiempos concretos tanto de agente como



de fenol. Mide la eficacia relativa de cada uno con respecto al fenol. Usa dos microorganismos prueba: *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*.

Se usan tubos con diluciones sucesivas de fenol, y de igual forma se hace con el agente a evaluar. Se adiciona el microorganismo, se toman muestras a distintos tiempos y se siembra para determinar si existe o no crecimiento. Se elige la mayor dilución que consigue matar a las células en 10 minutos, y se compara el resultado del fenol con el del agente sacando el coeficiente de fenol que es:

Dilución de fenol / dilución del agente.

**TEMA 6.- LA CÉLULA PROCARIOTA: PARED CELULAR.****BIOLOGÍA CELULAR BACTERIANA.****TAMAÑO**

Dentro de lo pequeña que son los microorganismos hay mucha variación de tamaño. Hay que usar microscopía.

Los *micoplasmas* no se ven a microscopía óptica.

Algunos procariotas son de gran tamaño.

Las *cianobacterias* son 500 veces mayores, casi se ven a simple vista. Ej. *Oscillatoris* tiene unas 7 micras de diámetro.


Como tamaño intermedio está *E. coli* que mide 1-0.5  $\mu\text{m}$ .


En 1985 se descubrió un simbiote de peces que se llama *Epulopiscium fishelsoni* que es  $10^6$  veces más grande que *E. Coli*, este simbiote tiene un tamaño de 600 x 800  $\mu\text{m}$  (0.6 mm).

El tamaño es característico para diferenciar la edad de las células.

El tamaño incide en el intercambio de nutrientes con el medio, a menor tamaño mejor intercambio.

Ej. Supongamos dos bacterias: A y B:

A   $r = 1$  ; superficie de la esfera =  $4\pi r^2$  ;  $V = 4/3\pi r^3$  ;  $S/V = 3$

B   $r = 1$  ; superficie de la esfera =  $4\pi r^2$  ;  $V = 4/3\pi r^3$  ;  $S/V = 3/2$

Crece más despacio cuanto más grande es la célula

El tamaño se define con un ocular micrométrico y se calibra para cada objetivo. Las dimensiones se dan según la forma del microorganismo si es redondo se da su diámetro pero si es alargado se da long. x long.

**FORMA**

- .- Esféricos: Cocos.
- .- Alargados: Bacilos.
- .- Curvados.
- .- Helicoidales.
- .- Espirales, etc.

Si los microorganismos viven en ambientes salinos la forma de éstos suele ser geométrica: cuadrados, triángulos, polígonos, etc. la forma afecta a la conducta y a la estabilidad.

Los Cocos se distorsionan menos, se disponen en el mismo plano si la célula madre se divide en la misma dirección:

Doble: diplococos.

Lineal: estreptococos.

Los Bacilos se dividen en una plano formando cadenas, no se separan.

Los curvados y espirales si se separan, por tanto no forman cadenas.

### ESTRUCTURAS SUPERFICIALES

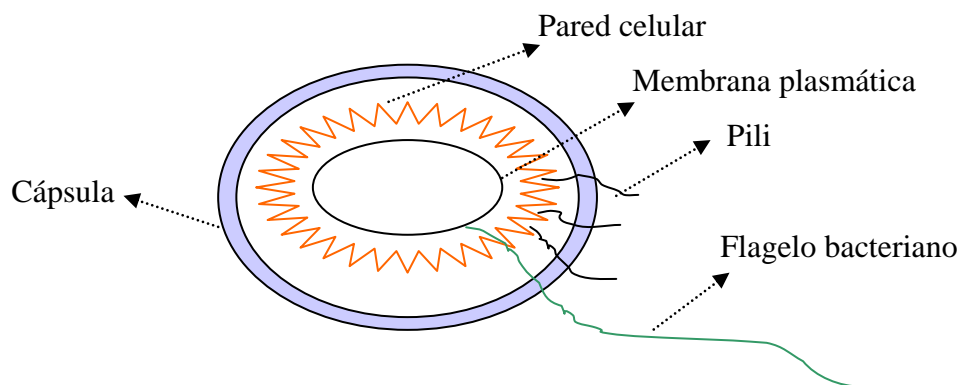
Dalton en 1953 aisló y purificó las paredes celulares rompiendo con bolas de vidrio y centrifugando. Vio que variaba dependiendo de la bacteria que cogían GRAM+ = GRAM-. Las lisozimas lisan a GRAM+, pero si aislamos las paredes se disuelven. Lo usó Weibull para preparar protoplastos de bacilos.

Los **protoplastos** tienen forma esférica, sintetizan macromoléculas, respiran, pero no se dividen, pueden reponer la pared celular en condiciones especiales y entonces pueden dividirse en medio isotónico). Si se ponen en agua estallan (medio hipotónico).

La **pared celular** protege del ambiente hipotónico, es responsable de la forma, interviene en la división, no influye en el metabolismo y *no es barrera osmótica ya que tiene permeabilidad selectiva*.

Los microorganismos pueden tener o no **Cápsulas**.

Los organelos filamentosos son los **pilis** y los **flagelos**.



**Membrana plasmática de eubacterias:** Rodea al protoplasma, es la principal barrera osmótica, no deja pasar los iones y regula el paso de nutrientes a ambos lados (selectiva y permeable). Posee un grosor de 8nm.

Por rayos X se ve que es una bicapa lipídica que posee un 40% de lípidos que en GRAM- son un 75% del total. Más del 40% son proteínas intrínsecas.

En *Salmonella* el 70-80% de los lípidos son fosfatidiletanolamina; el 15-25% es fosfatidilglicerol; y el 5-10% lo forma la cardiolipina. La diferencia entre fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol es acusado en Gram+ pero casi no existe en las Gram-.


No tienen esteroides pero poseen una molécula parecida que son los hopanoides, son importantes en la formación del carbono y el petróleo fósil, puede ser la molécula orgánica más abundante de la naturaleza.

Las proteínas son transmembranales, pueden atravesar la bicapa una o varias veces. Se pueden separar más de 100 especies diferentes de proteínas por electroforesis bidimensional.

La membrana es fluida como el aceite, la movilidad lateral de las proteínas está influida por los fosfolípidos, según el número de interacciones con los ácidos grasos, las interacciones hidrofóbicas o por puentes de hidrógeno mantienen la estabilidad de la membrana. A mayor número de dobles enlaces menor fluidez posee la membrana (los hipertermófilos tienen gran número de enlaces dobles).

Son estructuras muy plásticas que se fusionan dando vesículas que se usan en estudios de transporte a través de membrana. En GRAM+ son fáciles de aislar al ser la única membrana, se centrifugan. Pero en GRAM- hay más problemas ya que existen dos membranas, cuando se lisan y se someten a un gradiente se obtienen capas de distinta densidad que corresponden a la membrana externa ( $\rho = 1.22$ ) a la mezcla ( $\rho = 1.19$ ) y a la interna o plasmática ( $\rho = 1.14-1.16$ ).

Para teñir se usa tetraóxido de osmio que es impermeable a los iones, las cabezas polares se ven más oscuras, de esta forma vemos el grupo hidrofílico y observamos 3 capas, dos exteriores que aparecen brillantes y una interna oscura.

 → Negativo de la imagen real

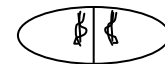
En *Arqueobacterias* nos encontramos una monocapa, los lípidos son éteres de glicerol, es decir en lugar de tener enlaces entre ácidos grasos tiene éteres entre alcoholes. También son ricos en derivados de isoprenos.

**Funciones de la membrana plasmática:**

- 1.- *Generación de energía.* En anaerobiosis pasan los electrones por la cadena, el microorganismo gasta ATP y se forma un gradiente que es usado para diversas funciones como puede ser de transporte. En aerobiosis es más sencillo ya que existe ese gradiente de forma simple, la respiración genera la fuerza motriz de protones al sacar  $H^+$ , que al entrar de nuevo generan ATP mediante una ATPasa.
- 2.- *Transporte.* Mediante permeasas que usan la fuerza protón- motriz para transportar solutos al interior.
- 3.- *Translocación de hidratos de carbono y proteínas al exterior,* sintetiza material de la pared celular.
- 4.- *Síntesis de lípido y carbohidratos.*
- 5.- *Señalización.* Detecta cambios ambientales.
- 6.- *Unión del cromosoma durante la replicación y degradación a las células hijas.*
- 7.- *Formación del septo* en la división celular.

El grosor de la membrana es constante, pero la extensión es variable. Por ello surgen diversos orgánulos:

.- **MESOSOMAS:** Son invaginaciones cercanas al septo, se piensa que pueden estar involucrados o no, pero todavía no se tiene una idea clara. Se cree que son artefactos que provocan las fijaciones cuando se preparan las muestras para el microscopio electrónico, sin embargo siempre se forman en el mismo sitio y se cree que existen zonas de la membrana diferentes que ejercen una función distinta.



.- Otras invaginaciones: surgen en muchos tipos de bacterias, (púrpuras, nitrificantes), todas respiran mucho y se piensa que estas invaginaciones surgen para acomodar más centros fotosintéticos o respiratorios. Por ejemplo las bacterias púrpuras sin  $O_2$  y con alta radiación poseen un mayor contenido en pigmentos como la bacterioclorofila y poseen mayor nº de intrusiones de membrana.

Las *Cyanobacterias* son especiales, no existe continuidad entre la membrana plasmática y los sacos membranosos (tilacoides) que albergan el aparato fotosintético.

**TRANSPORTE****1.- TRANSPORTE PASIVO.-**

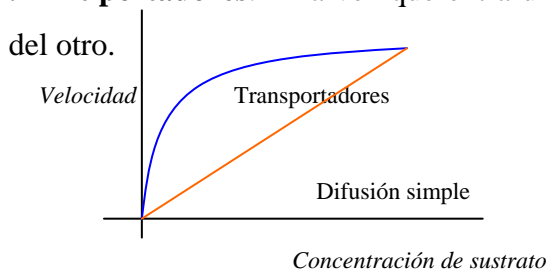
Es lento y poco común. El agua pasa de forma libre. Si ponemos glicerol pasa 1000 veces más lento que el agua, el sodio tiene una velocidad de  $1/10^6$ , el triptófano es  $1/10^5$  y los  $H^+$  no entran al estar cargados e hidratados.

Si se tratan con ionóforos se destruye la membrana y entra todo, ya no existe permeabilidad selectiva. Esto condujo a la conclusión de que existían transportadores de membrana

## 2.- TRANSPORTE MEDIADO POR PROTEÍNAS

Pueden ser:

- .- **Uniportadores:** El paso se da de forma directa.
- .- **Simpportadores:** El transporte se da por acople con otra sustancia.
- .- **Antiportadores:** A la vez que entra uno sale otro, el paso de uno favorece la salida del otro.



La gráfica que muestra la velocidad de la reacción cuando está mediada por proteínas es muy buena para microorganismos que viven en ambientes con baja concentración de nutrientes.

Los transportadores son proteínas transmembranales que sufren cambios conformacionales cuando se une el ligando, son específicas para una determinada clase de compuesto, siempre tienen gran afinidad.

Este transporte puede ser:

### A.- Mecanismos de transporte por difusión simple facilitada en bacterias.

Es poco frecuente en procariotas, no funciona contra gradiente, aunque sigue la cinética de Michaelis-Menten. Por ejemplo el glicerol entra y se acumula al ser fosforilado, (pasa de glicerol a glicerol-P).

### B.- Mecanismos de transporte activo en bacterias.

**1.- Transporte ligado a un gradiente de iones (hidrogeniones):** La sustancia no se modifica con el transporte. Está mediado por la fuerza motriz de protones.

Por *simporte*. Por ejemplo la lactosa- $H^+$ . la unión del protón antes o después, permite un cambio conformacional e introduce lactosa junto con  $H^+$ . Otro ejemplo es la melibiosa con  $H^+$  o  $Na^+$  (éste se forma a expensas del PMF: fuerza protón-motriz).

Por *antiporte* se intercambian  $H^+$ , entra un elemento y sale el otro. Por ejemplo, entra el fosfoglicerato que se antiporta con fosfato inorgánico y éste sale. El Na, Ca y K se intercambian por un protón, éste entra y los otros salen.

**2.- Transporte dirigido por ATP:** La sustancia no se modifica con el transporte.

**A.-** Existen unas **permeasas periplásmicas sensibles al choque osmótico**. Por éstas permeasas se transporta histidina, malato y arabinosa. En el transporte de histidina median cuatro proteínas:

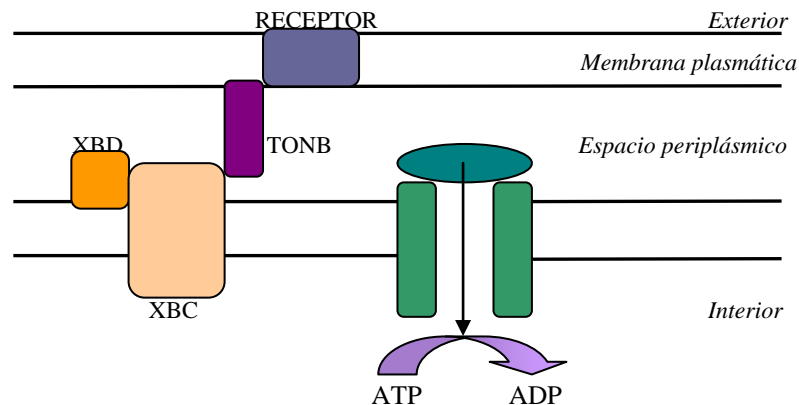
.- Proteína J: (Proteína de unión o BP) reconoce el sustrato y lo secuestra del medio quedando unido.

.- Proteínas transmembranales: son la proteína M y la proteína Q, son hidrofóbicas ya que atraviesan la membrana, forman un canal.

.- Proteína P: Lleva un motivo estructural que es el que une ATP. Estas zonas están conservadas evolutivamente, son ABC (ATP de cassette de unión o ATP binding cassette). Una vez secuestrado el sustrato se transporta por un canal. (La entrada de histidina conlleva un gasto de ATP), así por un extremo unen ATP y por el otro entra en la membrana interaccionando con el complejo M/Q y los otros fosfolípidos.

Las proteínas ABC forma parte de canales de influjo y eflujo. Las bacterias lo usan para sacar antibióticos fuera.

**B.-** Otros tipos de proteínas son **transportadores que actúan secuencialmente**. Transportan a través de 2 membranas. La membrana externa y la membrana plasmática. Se transportan vitamina  $B_{12}$  (proteína grande) o el sideróforo de hierro. Estos sistemas tienen por una parte un receptor de la membrana externa que une la sustancia, tiene un complejo que conecta este receptor a la membrana plasmática formada por XBC, XBD (proteínas de membrana) y otra proteína TON B que conecta la membrana plasmática con el receptor de fuera. Les dice al receptor que la membrana plasmática está energizada, se transporta primero al espacio periplásmico y por un sistema semejante al de la histidina la introduce dentro.



(El  $\text{Fe}^{3+}$  es muy insoluble, echan sustancias al exterior de bajo peso molecular (sideróforos), poseen alta afinidad por el  $\text{Fe}^{3+}$  y lo captan. El receptor posee apetencia alta por ello y lo toma).

**C.-** Existen otras ATPasas que son las **ATPasas de tipo P**, (son frecuentes en mamíferos) que son las Na/K ATPasas que median en el transporte en bacterias y las ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  (RE). Poseen una proteína grande que se fosforila en el aspartato durante el transporte, son permeasas que tienen aspartato, (todas las ATPasas tienen apártico). Cuando la concentración de K baja se desreprime el transportador y entra el K, alta  $[\text{K}^+]_{\text{int}}$  y baja  $[\text{Na}^{2+}]_{\text{int}}$ . La entrada de Mg también es por una ATPasa de tipo P. (ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{Na}^+$ ). En mamíferos los  $\text{H}^+$  y  $\text{K}^+$  acidifican el estómago.

**D.-** También están las **ATPasa de tipo A** que median la resistencia a iones como en el arsenato, actúan de dentro a fuera producen un eflujo. Producen resistencia al arsénico. Sacan del interior compuestos venenosos o metales pesados.

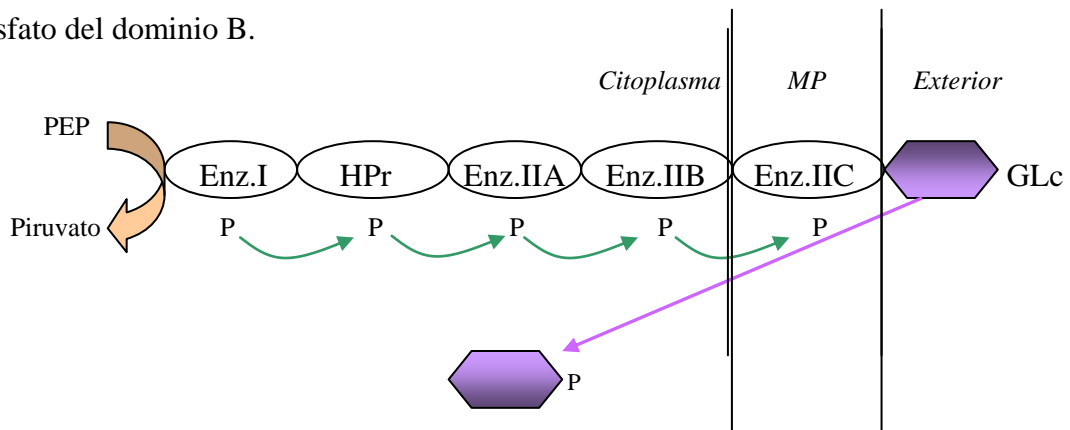
### 3.- Transporte por translocación de grupo:

Está también mediado por ATP, se gasta energía, *la sustancia se altera químicamente durante el transporte*. No hay gradiente porque la sustancia cambia de naturaleza química. La *fosfotransferasa* funciona en bacterias para realizar el transporte de muchos azúcares, éstos se fosforilan durante el transporte. Los azúcares pueden ser glucosa, fructosa, manosa, NAG, etc.

Intervienen proteínas comunes y específicas.



La energía proviene del fosfoenolpiruvato (PEP), sustrato inicial y mediante una enzima en el citoplasma se transmite el fosfato a la enzima I y sale el piruvato. La enzima I actúa con la proteína HPr (alto peso molecular y es estable al calor), transmitiendo un fosfato y queda fosforilada, esto ocurre en el citoplasma. En la membrana la HPr-P pasa el Pi a la enzima II que es una proteína de membrana diferente de unos sistemas a otros, es específica del azúcar que se transporte. En el caso del manitol esta enzima tiene 3 dominios (IIA, IIB, y IIC). Lo primero que se fosforila es el dominio IIA que da al citosol, tiene una his que se fosforila y luego se transfiere el fosfato a una cys del IIB, y por último el IIC es la proteína que reconoce y transporta al manitol fosforilándolo con el fosfato del dominio B.



Las bacterias usan diferentes sistemas para transportar las mismas proteínas. También se transportan otros elementos, como bases púricas, pirimidínicas y ácidos grasos.

Existen distintos mutantes:

.- *Generales*: cuando la mutación afecta a los dominios o proteínas de la enzima I que son generales y comunes para todos. Afecta al transporte de todos los azúcares transportados por proteínas.

.- *Específicos*: son mutantes en los dominios específicos para azúcares concretos.

En el caso de la glucosa el dominio IIA se llama enzima III, y es diferente.

### **RECORDAR**

- 1.- Se forma un gradiente de protones, que en aerobios es la cadena de transporte de electrones y en anaerobios es con gasto de ATP.
- 2.- La concentración de protones fuera es superior a la interior dando un potencial electroquímico y por tanto una fuerza protón- motriz.  $[H^+]_{fuera} \gg [H^+]_{interna}$

- 3.- La disipación de la fuerza protón motriz produce síntesis de ATP o también puede servir para transportar sustancias ligado a gradientes.
- 4.- El ATP puede ser usado en el transporte por: ABC-ATPasa; ATPasa tipo P; ATPasa tipo A.
- 5.- Los  $H^+$  pueden ser usados en el simporte como por ejemplo de la glucosa, o en el antiporte como sucede con el  $Na^+$  o el K,
- 6.- En bacterias NO existen bombas de  $Na^+/K^+$ .

### LA PARED CELULAR

(Pág. 70-77 Brock)

La pared celular se puede ver al microscopio electrónico. El principal componente de la pared de eubacteria es el **peptidoglicano** (no lo tienen las arqueobacteria, algunas tienen algo semejante llamado pseudoglicano y otras un polisacárido complejo sulfatado, otras poseen glicoproteínas).

#### COMPOSICIÓN.-

Se forman por cadenas lineales de polisacáridos que forman hélices, está formado por la *N-acetil-glucosamina* (NAG) unida al *acetil murámico* (NAM) mediante un enlace glicosídico  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , este enlace que forma el dímero NAGRAM-NAM es el que rompen las lisozimas.

El grupo carboxilo del NAM se une al grupo amino de una L-ala y ésta se encuentra unida a otros aminoácidos formando un *tetrapéptido*. El tetrapéptido tiene un  $R_3$  que está unido por el carbono  $\gamma$  al D-glutámico, éste  $R_3$  puede ser la L-ala, lo normal es que sea una L-lys (diaminoácido) que es frecuente en las Gram+. En las Gram- es más abundante un precursor de L-lys que es el ácido diaminopimélico, éste puede ser meso-diaminopimélico en las Gram- o 11-diaminopimélico en las Gram+. Otro aminoácido posible es la ornitina que es típico de espiroquetas.

Los tetrapéptidos están unidos covalentemente entre sí por puentes interpeptídicos, es decir, se une un tetrapéptido con otro, esto da rigidez y la unión puede ser de distinta forma:

- .- Existen casos en los que el carboxilo de la D-ala se une con el amino de la L-lys, este es un enlace directo.
- .- En GRAM+ suele haber un puente interpeptídico que puede ser de varias maneras: 5 gly, 3ala y 1 treonina, L-ala-L-ala.

.- El mismo tetrapéptido puede hacer de puente interpeptídico se une el carbono  $\alpha$  del NAM con el amino de a D-ala.

Existen muchos peptidoglicanos distintos a lo que se llaman quimiotipos, el quimiotipo varia mucho en las Gram+ y no lo hace tanto en la Gram-. Debido a variaciones en el tetrapéptido y en el puente interpeptídico hay más de 100 quimiotipos distintos en bacterias.

**Estructura general:** grandes cadenas de polisacáridos paralelas con sus tetrapéptidos formando un enlace de  $90^\circ$  y unidos entre si por un puente que involucra a la D-ala y el aminoácido  $R_3$ . Esto da una estructura tridimensional que rodea a la bacteria y es lo que da la resistencia.

El grado de entrecruzamiento varía de unas células a otras, a mayor grado de entrecruzamiento, mayor solidez. En Gram- sólo hay una capa mientras que en Gram+ hay varias, además en las bacterias Gram- sólo hay uniones de tipo directo mientras que en las Gram+ existe todo tipos de uniones.

### PARED CELULAR DE LAS GRAM NEGATIVAS

Membrana externa   
 Peptidoglicano  
 Membrana plasmática

Las GRAM- poseen una membrana multicapeada al tener peptidoglicano y membrana externa. Si la tratamos con fenol extraeremos las proteínas y el lipopolisacárido, nos quedamos con el peptidoglicano más proteínas que están unidas covalentemente a él, lipoproteínas. Si tratamos con lisozima se rompe el peptidoglicano y queda sólo la lipoproteína. Para eliminar las proteínas se trata con proteasas y al final tenemos fragmentos dializables.

Fenol  $\rightarrow$  PEG + Lipoproteínas.

Lisoenzimas  $\rightarrow$  Lipoproteínas.

Proteasas  $\rightarrow$  PEG.

Lisoenzima + proteasas  $\rightarrow$  Fragmentos dializables.

El peptidoglicano posee un bajo grado de entrecruzamiento y es muy fino. Todo el NAM y NAG sólo sirve para dar una vuelta a la célula. La pared celular tiene una membrana típica externa, no es una membrana normal, ésta membrana tiene los fosfolípidos de forma asimétrica en su distribución aunque el grosor es semejante al de

una membrana normal. Tiene proteínas diferentes a las de la membrana plasmática y su estructura también es distinta. Existen diferentes especies de moléculas y hay 200 moléculas por célula aproximadamente.

Los fosfolípidos miran sólo hacia la cara interna, hacia el exterior hay otras sustancias que son los *lipopolisacáridos* que reemplaza al fosfolípido. El lipopolisacárido se denomina **endotoxina** y es responsable de la toxicidad de las bacterias.

(dibujo pág. 77 Brock)

### COMPOSICIÓN DEL LIPOPOLISACÁRIDO.-

El lipopolisacárido es exclusivo de Gram-.

.- Tiene una zona interna que es el **lípidio A**, éste tiene dos subunidades de glucosamina unidas mediante enlace  $\beta(1\rightarrow6)$ , por un lado están esterificadas y al menos tienen dos hidroxilos esterificados con el OH de ácidos grasos saturados o hidroxiácidos, esto le da el carácter lipídico.

.- El **núcleo** está formado por 2 ó 3 KDO (cetodesoxioctanato) unidos a 2 ó 3 heptosas y a unas hexosas y NAG.

.- La **cadena lateral** también llamado **antígeno O** está formado por un tetra o pentasacárido repetitivo formado por azúcares normales y otros raros.

### GENERALIDADES DE LA PARED CELULAR DE GRAM-.-

Tras la membrana hay un espacio periplásmico, aquí hay oligosacáridos solubles, el peptidoglicano (es muy fino, con bajo grado de entrecruzamiento) y tiene también proteínas. Luego está la membrana externa con fosfolípidos en la cara interna de la bicapa y sin ellos en la capa externa en la que existe el lipopolisacárido.

Es importante la presencia de cationes bivalentes como el  $Mg^{2+}$  que estabiliza los grupos ácidos como los del KDO, estabilizan en general a la membrana.

Hay proteínas que forman poros, otras que unen el peptidoglicano con la membrana y otras diferentes.

### TIPOS DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA.-

Existen dos tipos de proteínas:

**1.- Hoja plegada en  $\beta$ :** la proteína se pliega de esta forma, no son hidrofóbicas, son muy hidrofílicas y son resistentes a la hidrólisis o a la desnaturalización. Tenemos:

A.- **Omp A** de *E. Coli* son semejantes a otras como oprF de *Pseudomonas*, estabilizan la membrana externa (sus mutantes se redondean) y son importantes en la conjugación con células redondas. Son sensibles a la desnaturalización. Son como porinas. Forman monómeros y sólo un 2% ó 3% de ellas se pliegan en condiciones. Son muy abundantes.

B.- **Porinas** son las porinas típicas formadas por 3 proteínas que hacen un trímero, cada presenta un poro o canal. Se diferencian por el tamaño del canal y por las condiciones ambientales que estimulan su síntesis, son trímeros de proteínas. Hay distintos tipos:

.- No específicas: son trímeros que forman canales acuosos con una elevada permeabilidad para moléculas de pequeño tamaño (600-700D), prefieren cationes aunque no son muy selectivas (pasan fosfatos, péptidos pequeños, etc.). Un ejemplo es la OmpC de *E. Coli*, que da poros pequeños, o la OmpF que forma poros mayores que la anterior, la formación de ésta porina se reprime a los 37°C y a elevada presión osmótica, al reprimirse ésta queda ompC.

.- Específica: Forman canales específicos y siguen la cinética de Michaelis-Menten. Forman canales acuosos específicos para cada sustrato, son como transportadores. La más estudiada es Lam B que es específica para la *maltosa* y la *maltodextrina*, es inducible, la entrada de moléculas se da por difusión. La molécula de maltosa es 1000 veces mayor a otros elementos. Además de transportadores también son receptores, algunos de estos receptores son aprovechados por fagos Lam B es usado por el fago  $\lambda$ . Otro ejemplo es la Tsx que está implicada en el paso de nucleótidos y es el fago T6 el que se aprovecha. (Ton A está involucrada en la entrada del ferricromo).

.- Receptores de alta afinidad: median en el transporte dependiente de energía de elementos (nutrientes) de mayor tamaño junto con otras proteínas que transportan la electricidad, aon muy específicos y no son poros abiertos. Por ejemplo: el transporte secuencial. Se media en el transporte por ejemplo de la vitamina B<sub>12</sub>, el sideróforo de Fe (proteína que la bacteria echa fuera y capta el Fe externo introduciéndose de nuevo usando receptores de alta afinidad). Así pues median en el transporte de nutrientes que están en baja concentración.

**2.-Proteína de Braum:** es una lipoproteína pequeña de unos 7500D, existen muchas moléculas por célula ( $1 \times 10^5$  mol/cél). Tiene una cisteína en el amino terminal que es la que se inserta en la membrana externa. El S forma un tioéster con un glicerol. El extremo amino tiene carácter hidrofóbico, es lo que se introduce en la membrana externa anclándose con los ácidos grasos. El carboxilo terminal se une a una cisteína.

Esta proteína se une a los peptidoglicanos. En el carboxilo terminal existe una lisina. Una característica es que los mutantes se hinchan.

#### **FUNCIONES DE LA MEMBRANA EXTERNA.-**

\* **1.- Es barrera de exclusión,** no deja pasar proteínas que dañarían las células como son las toxinas, proteasas, peptidasas, etc. excluye sustancias hidrofóbicas o anfifílicas. No dejan pasar los detergentes.

Esto es debido al polisacárido. Si se desorganiza el lipopolisacárido la célula es más sensible a los antibióticos. La politrisina m ejerce las mismas funciones que el mp A, antibiótico autopromovido por el propio antibiótico, compite por los cationes con el lipopolisacárido. Si añadimos EDTA, (que secuestra los cationes y actúa quelando y por tanto desorganizando el lipopolisacárido), el antibiótico tiene mayor efecto. En los mutantes aumenta la permeabilidad de la membrana a sustancias hidrofóbicas cuando se pierden azúcares externos aumentando los fosfolípido de la membrana externa.

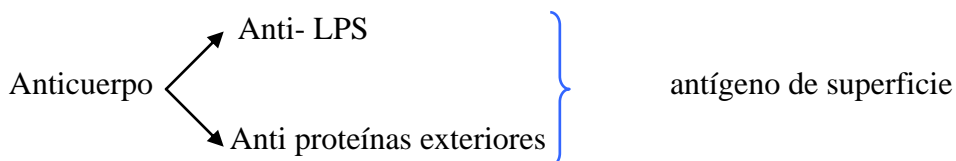
El antígeno O es importante porque hay patógenos que tienen este elemento muy corto se habla entonces de *lipooligosacárido*, son tremendamente susceptibles a detergentes, a péptidos catiónicos (de insectos) y a las sustancias hidrofóbicas.

\* **2.- Permeabilidad.** Las porinas son responsables de que sea permeable a ciertos agentes.

\* **3.- Secreción de sustancias al exterior.** Siempre tienen unas bombas de eflujo conectadas con la membrana plasmática, con un canal. Usan el sistema ABC para expulsar las drogas, antibióticos etc. por estos canales, entonces usan MF (facilitador principal). Se secretan sustancias como metabolitos, el sideróforo del Fe. Compuestos de las cápsulas, toxinas, etc.

\* **4.- Previene la salida de proteínas periplásmicas** como las enzimas digestivas. Tienen proteínas que unen substratos BP, para transportarlos luego o para la quimiotaxis. Tiene chaperonas. El periplasma es en sí un gel.

\* **5.- Interacciona con el ambiente,** con los antígenos de la superficie.



Los mutantes deficientes en el antígeno O (son rugosos) son sensibles a una sustancia de la sangre llamada **complemento** (sustancia que permeabiliza la membrana)

\* **6.- Anclajes de estructuras superficiales.** Como pilis, flagelos, cápsidas. Hay zonas de contacto físico de la membrana plasmática con la membrana externa, son placas de Bayer, se cree que son zonas en las que existen elementos de conexión.

### PARED CELULAR DE LAS GRAM POSITIVAS

Al microscopio electrónico aparece más gruesa porque tienen más peptidoglicanos (80% del peso seco). Tiene 40 capas a diferencia de 1 ó 2 de *E. Coli*. Tiene un elevado grado de entrecruzamiento. No pierden el cristal violeta cuando se tiñen.

Tienen un compuesto que no lo tienen las Gram- que son los **ácidos teicoicos**, son raros en la naturaleza, son polialcoholes, polímeros del glicerol y azúcares, están unidos por enlace fosfodiéster, que unen dos glicerol, esto está repetido de 10 a 30 veces.

Este elemento es una unidad repetitiva. La cadena R puede ser azúcares, aminoácidos, etc. éstos están unidos al carbono 6 del NAM, éste carbono se une por un enlace fosfodiéster a la glucosamina, al 3-glicerol-fosfato y al polisacárido.

Se extienden hacia la superficie de la célula quedando a diferentes alturas. Hay una pequeña proporción de estos elementos que se unen a un glicolípido de la membrana en lugar de unirse al NAM. Son lipoteicoico. Forman **anticuerpos** contra sustancias, son antígenos de superficie.

Una función importante que se le atribuye es la de lisis para estos elementos, es **autólisis**, rompen al peptidoglicano para poder crecer. Se cree que la función de estas autólisis las controlan los ácidos teicoicos.

No son comunes, las micobacterias tienen ácidos micólicos (son las únicas que tienen estos ácidos).

Las Gram+ no tienen un gran espacio periplásmico y las proteínas de éste no están unidas, están ancladas a la membrana plasmática. Una vez que se forman estas proteínas se les añade un lípido y se anclan a la membrana pudiendo actuar hacia el exterior. Las proteínas de las Gram+ pasan al medio de cultivo y se diluyen.

Ej. La penicilina,  $\beta$ -Galactamasa, la penicilina es muy efectiva en las bacterias Gram+ e inefectiva en las Gram- ya que la membrana es muy impermeable. Las bacterias Gram+ necesitan expulsar más proteínas para la misma acción porque se diluyen.

## CÁPSULAS

Es una capa de **polisacáridos** que adherida a la pared rodea a la célula. Es secretada por la célula. Es abundante y no soluble en agua por lo que forma una capa. Ésta capa es mucosa cuando no es tan abundante.

En general se llama **glicocalix** a toda sustancia secretada que rodea a la célula.

En el laboratorio tiende a perderse, en la naturaleza hace de protección contra protozoos.

Tiene carga negativa y repele aniones, la carga negativa dificulta la unión a la pared de moléculas cargadas negativamente como son los anticuerpos. La cápsula protege de fagos. El fago hace un agujero en la cápsula para llegar a los receptores de membrana que sean atacados.

Para verlas se usa tinción negativa o tratamientos con anticuerpos, con éstos la cápsula se hincha, aumenta el índice de refracción al unirse los anticuerpos.

### TIPOS DE CÁPSULAS

**1.-** Formadas por polímeros de aminoácidos, por un único aminoácido, el D-Glutámico, un ejemplo es el género *Bacillus anthracis*.

**2.-** Formadas por azúcares, son polisacáridos. Es más normal. Existen dos tipos:

2.A.- La síntesis se da en el interior de la célula. Se sintetizan a partir de intermediarios de alta energía, como son los precursores nucleotídicos del azúcar (UDP-glucosa, UDP-galactosa, etc.). Ejemplos.

*Azotobacter xilinum* (vinagre) → cápsulas de celulosa. (  $\beta(1\rightarrow4)$ glucosa)

*Pseudomonas aeruginosa* → cápsulas de ácido muniturónico.

*Agrobacterium tumefaciens*. →  $\beta(1\rightarrow2)$ glucosa

*Azotobacter* → cápsulas de ácido glucurónico.

*E. coli* → la parte externa de la cápsula se llama antígeno K (existen 80 tipos diferentes). Se gasta energía, usa nucleósidos di-fosfatos azúcares. Un ejemplo común es el ácido siálico.

2.B.- Usan substratos externos para sintetizar la cápsula.

*Leuconostoc*. Sacarosa → Fructosa → Glucosa. Unen glucosa a la fructosa gracias a la energía que se obtiene al romper la sacarosa en fructosa más glucosa. Uso de *Glucanos*



y *dextranos*. La cápsula de dextranos es de sacarosa. El exopolisacárido lo forman levanos y dextranos que se forman a partir de sacarosa.

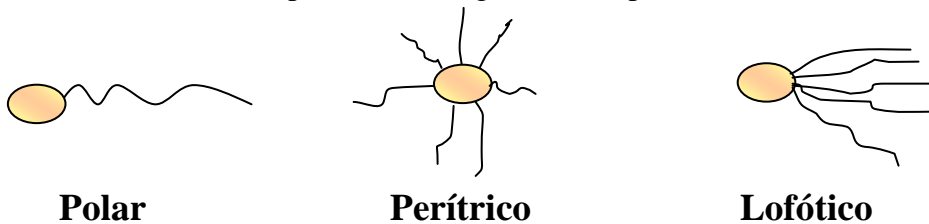
***Pseudomonas***. Son *levanos* polimerizan la fructosa uniéndola a la glucosa.

glc-frc-frc-frc-

**TEMA 7.- FLAGELOS Y MOTILIDAD. APÉNDICES CELULARES. FORMAS DE RESISTENCIA.****FLAGELOS**

Son apéndices largos y delgados de unos 5-10 micras de longitud y 20nm de diámetro. Los flagelos poseen un peso molecular de 40000D y las fimbrias de 17000D. Pueden existir unos 5-10 flagelos por célula. Hay distintos tipos:

- .- F. Polares: sólo hay un flagelo en un polo.
- .- F. Peritricos: hay varios que rodean el perímetro de la célula.
- .- F. Lofóticos: existe un penacho de flagelos en un polo.



Están compuestos por proteínas específicas como son la *flagelina* y la *pilina*.

Los flagelos son filamentos helicoidales, mientras que los pilis son rectos, se pueden aislar mediante dos formas:

- \* por agitación mecánica: se obtiene un helicoide 100 veces más rígido que la actina. Este filamento llamado *flagelina* es hueco. Al aumentar el pH da otra estructura, al poner un pH = 7 vuelve a su forma natural. Al agitar se rompen en un punto cerca de la superficie celular.
- \* por obtención de protoplastos que se lisan con detergente. A diferencia del anterior se obtienen con la estructura basal intacta (no se rompen por la base)

La **estructura del flagelo** posee tres regiones: (dibujo pág. 85 Brock)

- 1.- Región externa:** Lo forma el filamento de flagelina, que acaba en una proteína. Se une cerca de la superficie celular con el gancho.
- 2.- Región del gancho:** Formado por una proteína diferente a la flagelina, es helicoidal y corta. Tiene proteínas adaptadores flexibles que acoplan el gancho al filamento. El gancho dirige el flagelo.
- 3.- Cuerpo basal:** Con una proteína que da el anillo S que mueve rígidamente el vástago, totalmente dentro de la envoltura celular. Tiene dos anillos el L y el P. El P

está en el peptidoglicano y el L en la membrana externa. Son estabilizadores. L y P sólo existen en Gram-, no los tenemos en las Gram+.

**4.- Proteínas mot a y mot b:** Están alrededor del anillo interno unido a la membrana plasmática. El motor está por debajo de la membrana plasmática. Es el que contiene el motor, son las proteínas que pasan la energía química en mecánica. Forman el canal para transformar la energía protón-motriz en energía de giro. Provocan la rotación del filamento.

### FORMACIÓN DEL FLAGELO (autoensamblaje)

Está asociada a la división celular.

- Los elementos del cuerpo basal se sintetizan en el interior de la célula.
- Se ensambla el cuerpo basal, luego se secretan los anillos L y P estabilizadores a través de un agujero. Se secretan sus componentes al espacio periplásmico y se ensamblan. También salen a través del cuerpo basal los del gancho.

Los del filamento los controla el gen  $\sigma^{28}$ . La flagelina se sintetiza cuando se han ensamblado el resto.

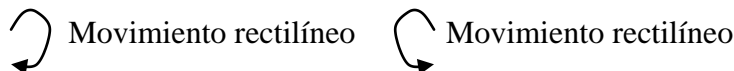
$\sigma^{28}$  está inactivada por la proteína Flg m que es una proteína secretable. Cuando se ha sintetizado toda la parte basal se secreta Flg m y  $\sigma^{28}$  queda libre y dirige la transcripción de las proteínas del filamento.

El filamento se alarga, baja la exportación de Flg m, al acumularse inactiva a  $\sigma^{28}$ , para la transcripción. Flgm es la flagelina que controla su propia síntesis.

→ Expresión génica asociada a la morfología:

Los flagelos son agentes del movimiento. La velocidad es de 10 cuerpos celulares por segundo. *Pseudomonas* se mueve a 37 cc/s, es muy rápida.

Los flagelos son rotores helicoidales semirígidos que giran reversiblemente. Así se propulsan hacia adelante. Cuando giran al contrario de las agujas del reloj van rectos, cambian y viran poniendo los flagelos en distintas posiciones.



## QUIMIOTAXIS

(pág. 87 y 242 Brock)

Las bacterias se mueven al azar aunque pueden concentrarse cerca de una sustancia, se mueven hacia ciertos estímulos químicos cuando éstos están en el ambiente.



Al variar las concentraciones de una sustancia química las bacterias pueden ir hacia la zona donde existe mayor concentración o pueden huir, atrayentes y repelentes respectivamente. Suelen ser nutrientes o sustancias nocivas. También responden al pH, temperatura, oxígeno y a veces a la densidad celular. Pueden concentrarse o no.

### ¿Cómo detectan las sustancias químicas?

Poseen unas proteínas periplásmicas que actúan como receptores primarios, son BP, tienen dos dominios, uno amino y otro carboxilo, unidos por una región llamada región de la bisagra, un dominio se cierra sobre el otro y secuestra la sustancia. Cada grupo de sustancias tiene una BP y todas tienen la misma estructura.



Estas proteínas contactan con las **MCP** que son proteínas de la quimiotaxis, son proteínas aceptoras de metilos además las BP conectan con transportadores de azúcares, que no usan las MCP, sino que usan el sistema de la fosfotransferasa. Las que están unidos a las MCP no lo están a las otras y viceversa.

Se han descubierto receptores 1° y los receptores de membrana (MCP) con los que conectan.

Ej. En *E. coli* Existe el receptor *mgl B<sub>3</sub>* que reconoce a la galactosa y glucosa, funciona en el transporte usando una ruta y también funciona en la quimiotaxis, aquí conecta con una proteína de membrana que es MCP III o Trg

RECEPTOR	LOCALIZACIÓN	AZÚCAR	FUNCIÓN	PROTEÍNA MEMBRANA
DPP-E	Periplasma	Dipéptido	Tte. y Quimiot.	TapE ó MCP IV
Mal-E	Periplasma	maltosa, metales pes.	Tte. y Quimiot.	MCP II ó Tant
Rbs-B <sub>E</sub>	Periplasma	Ribosa	Tte. y Quimiot.	MCP III ó Trg
Rbs-B <sub>S</sub>	Periplasma	Ribosa	Tte. y Quimiot.	MCP III ó Trg

A veces el receptor 1° es una proteína transmembranal, no necesita otra proteína. Ej. sistema Tsr<sub>E</sub> que se llama MCP I, sólo funciona en quimiotaxis, no funciona nunca en transporte.

Otro caso es que el receptor 1° también actúe como receptor 2° para otra sustancia. Ej. Aspartato (1°) y maltosa (2°).

La aerotaxis es la detección de oxígeno, en este caso lo usan las misma proteínas.

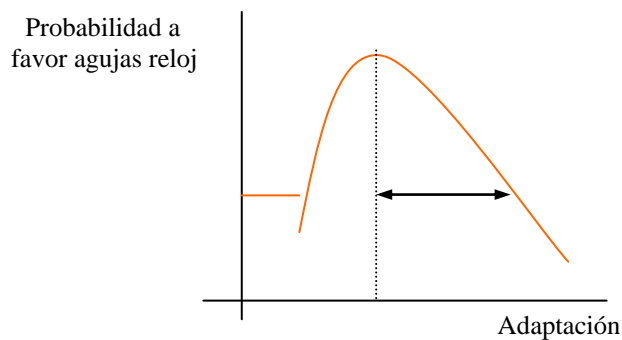
En ocasiones son redundantes para el oxígeno hay una MCP de aerotaxis. El O<sub>2</sub> es detectado por Tsr<sub>E</sub> y aer.

**.- BP o receptores de membrana son detectores de gradientes:**

Las células son capaces de hacer comparaciones temporales, comparan la situación inicial y la de 3 ó 4 min. después. Se mueve y toma una decisión, vira o sigue nadando en línea. Las BP detectan gradientes, pero no pueden saber o comparar concentraciones de sustancias a un lado y otro, tiene una especie de memoria y comparan situaciones de momentos distintos.

En 60min. a 30 micras/s recorren 1.8 mm (100 veces su largo)

Cuando el flagelo peritrico va en contra de las agujas va recta. Si el estímulo es favorable (+ atrayente o menos repelente) la excitación aumenta la probabilidad del rodaje en contra de las agujas del reloj y la bacteria sigue en línea recta. Después la bacteria se adapta a las nuevas condiciones para poder responder a un nuevo estímulo.



Si la excitación se mantiene mucho la bacteria suprime los virajes. Acelera la frecuencia de virajes si el periodo de adaptación se acorta mucho y se acumula información desfavorable.

Si el estímulo es desfavorable la excitación va a incrementar la probabilidad de ir a favor de las agujas del reloj produciendo viraje.

Si no existe estímulo la bacteria se mueve al azar dando tumbos.

**SISTEMA BIOQUÍMICO DE LA TRANSMISIÓN DE LA INFORMACIÓN**

(pág. 241)

Son sistemas regulatorios de dos componentes: tenemos una señal recogida por un sensor y la transduce por un transmisor a una molécula efectora. Esto se puede hacer a nivel de un promotor en el DNA (síntesis de OmpO, OmpF, esporulación y síntesis de N).

Otro sistema de dos componentes es la rotación del flagelo que es el efector final.

Los receptores son proteínas transmembranales que se metilan (MCP), forman dímeros, reciben las señales de sustancias unidas a BP.

El transmisor es una quinasa (Che A) y una proteína auxiliar que controla la actividad (CheW). La proteína Che A tiene diferentes dominios:

- .- Dominio Che Y → es el efector
- .- Dominio quinasa.
- .- Dominio para unirse a MCP
- .- Che W.

Che A se autofosforila en la his 48.

El efector es Che Y que recibe el grupo fosfato de Che A (el fosfato pasa de la his48 al asp57) y cuando está fosforilado induce la rotación a favor de las agujas del reloj uniéndose a la proteína *fli M* del motor del flagelo en el anillo C del mismo.

Cuando las MCP tienen la Che W, Che A se autofosforila y pasa el fosfato a Che Y, entonces el flagelo gira a favor de las agujas del reloj y la bacteria **vira**.

Al unirse un atrayente Che A no se autofosforila y por tanto tampoco se fosforila Che Y y el flagelo gira en contra de las agujas del reloj y la bacteria va en **línea recta**.

Los atrayentes inhiben la actividad quinasa.

<b>Mutante Che Y</b> <b>Mutante Che A</b> <b>Mutante Che W</b>	}	<b>No viran. No se fosforilan.</b>
--	---	------------------------------------

**ADAPTACIÓN.**

Siempre existe probabilidad de que cambie el sentido del movimiento, esto se debe a que existe una adaptación que restaura a capacidad de respuesta. Tiene lugar en dos niveles:

1.- Desfosforilación de Che Y. Parte de esta desfosforilación es lenta y espontánea, pero la mayoría es debida a Che Z que es una fosfatasa específica de Che Y y le quita los fosfatos.

### **Mutante Che Z → viraje**

2.- Metilación y desmetilación del receptor MCP. Las MCP no responden a los atrayentes cuando están totalmente metiladas. Che R está continuamente metilando a las MCP y Che B es la encargada de quitar los metilos.

.- Al aumentar el repelente aumenta la metilación de las MCP y cuando están metiladas aumenta la fosforilación de Che A y la célula vira, ya que es como si no hubiese repelente debido a que las MCP metiladas responden mal a él y sin repelentes Che A se autofosforila.

.- Si aumentan los atrayentes aumenta la desmetilación de las MCP y esto disminuye la estimulación de Che A para fosforilarse y aumenta las posibilidades de que la célula vaya en línea recta, esto se debe a que cuando está la sustancia unida Che A no tiene tanta facilidad de autofosforilarse. Las MCP totalmente metiladas responde muy bien a los atrayentes.

Así al aumentar el repelente aumenta la metilación y el equilibrio se desplaza hacia la izquierda se fosforila Che A y va a favor de las agujas y vira.

La metilación está controlada por Che B que al fosforilarse desmetila, tiene un dominio terminal regulatorio, es una esterasa que quita los grupos metilos. Es inactiva si no está fosforilada y es Che A quién le da los fosfatos. Che R es la otra proteína que actúa en la regulación, es una metiltransferasa y metila cuando está unida la sustancia, coge los metilos y se los pasa a las MCP.

**Mutantes Che B → viraje**

**Mutantes Che R → recto.**

**Doble mutante → fenotipo silvestre**

### **HIPÓTESIS**

La afinidad del receptor por el ligando depende del nivel de metilación, al aumentar la metilación disminuye la afinidad por el ligando y por tanto Che A se autofosforila y aumenta la fosforilación de Che Y y de Che W. Cuando un receptor está unido a un atrayente se está metilando disminuyendo 100 veces su sensibilidad. Mutantes que no metilan tienden a ir en línea recta.

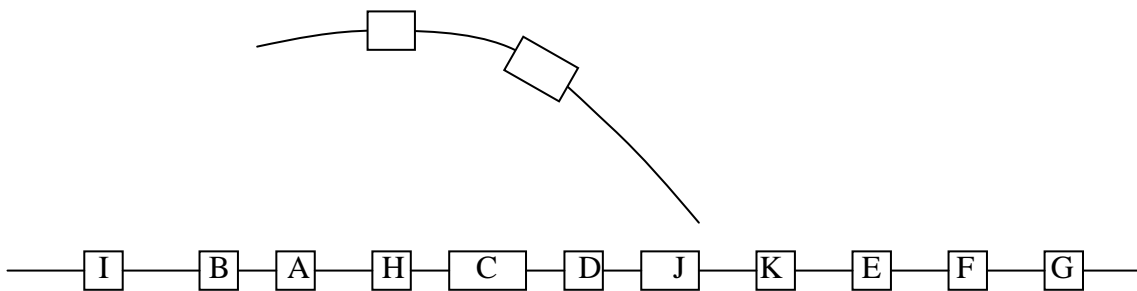
Cuando hay mucho repelente da viraje. Al metilarse se fosforila Che A, al revés que con el atrayente.

### FIMBRIAS

Los *pilis* son apéndices cortos y numerosos, están involucrados en la conjugación. Las *fimbrias* son apéndices involucrados en la adhesión a superficies sólidas, existen diferentes tipos, todos excepto el de tipo IV están implicados en adhesión, éste es de movilidad.

La estructura de las fimbrias es semejante a la de los flagelos. Está formada por una proteína llamada *fimbrina* que se polimeriza y origina un filamento helicoidal de 7 nm y con un agujero central. Suelen ser rígidas, pero tiene en la punta una región flexible (tipo I ó PAP) involucrada en adherencia al tracto intestinal.

Otras son flexibles como K88 (antígeno de superficie de *E. coli*) se adhieren al epitelio intestinal.



Las proteínas se añaden por el extremo proximal, k es un adaptador. H Sirve de anclaje de la fimbria a la membrana externa de una Gram-. La proteína D es un Chaperón (ayuda al plegamiento) cuando se secreta las otras proteínas ésta proteína D las ayuda a plegarse, en su ausencia las proteínas no salen fuera y otra proteína entonces las degrada (proteasa de membrana). Otra proteína ayuda a plegarse a D formando puentes disulfuro

- \* **Proteína A**: Es la mayoritaria y está unida a la proteína C.
- \* **Proteína C**: Tiene un papel activo en determinar el orden de salida de las diferentes proteínas, es el acomodador.
- \* **Proteína H**: Es de anclaje y une C a A.
- \* **Proteína D**: estructura semejante a las inmunoglobulinas. Chaperón que ayuda al correcto plegamiento.



- \* **Proteína K**: Adapta la región rígida a la flexible, tiene 3 proteínas: G, E y F.
- \* **Proteína G**: Es una proteína con dos dominios: el **amino (N)**, reconoce glicolípidos de membrana. y **carboxilo (C)**, reconoce chaperones para el correcto plegamiento. D reconoce a C.
- \* **Proteína E**: Es el compuesto mayoritario de la región flexible.
- \* **Proteína F**: Adapta a E a la punta que es G, ésta es la adhesina que se une a las membranas celulares.

Los glicolípidos que reconoce la proteína G son derivados de la crema, hay distintos tipos el más simple es abundante en el trato urogenital. Aunque existen otros más complejos añadiendo azúcares.

La célula bacteriana se pega al tracto urogenital debido a esta adhesión y luego provoca la colonización. Esto es importante porque el tratar con compuestos antiadhesivos podría prevenir la colonización y por tanto las infecciones.

## **TEMA 8.- LA CÉLULA PROCARIOTA: CITOPLASMA, ORGÁNULOS CITOPLASMÁTICOS Y REGIÓN NUCLEAR.**

### **INTRODUCCIÓN**

Los **organelos** no están rodeados de una membrana sino que están rodeados de una capa de proteínas.

Los orgánulos pueden ser:

- 1.- Vacuolas de gas.
- 2.- Vesículas de chlorobium: clorosomas.
- 3.- Carboxisomas.
- 4.- Magnetosomas.
- 5.- Inclusiones de Reserva.

### **1.- VACUOLAS DE GAS**

(pág. 93 Brock)

- .- Están formadas por vesículas de menor tamaño, que son vesículas de gas.
- .- Ayudan a flotar (la densidad de la célula es menor que la del agua).
- .- Tienen 75 nm de diámetro y la longitud varia de 200 a 1000 nm.
- .- Están limitadas por una capa proteica de 2nm hidrofílica exteriormente e hidrofóbica interiormente. Es una membrana rígida para poder soportar la presión.
- .- La proteína mayoritaria tiene un peso molecular de 8000 KD. Tiene pocos aminoácidos aromáticos.
- .- Es permeable a los gases. Los gases que contiene son los del medio ya que la membrana es permeable.
- .- Cuando se forma excluye el agua, por lo que es hueca, si se presiona se colapsa y han de formarse de nuevo, (si se rompe se llena de agua).
- .- Sólo existe en procariotas acuáticas. Regula la capacidad de flotación, lo que permite tomar una posición favorable según luz, O<sub>2</sub>, nutrientes, etc.
- .- Está en arqueobacterias, cianobacterias, bacterias púrpuras y verdes y algunos heterótrofos. El caso más llamativo es el de *Cianobacterias* que dan en los lagos acúmulos masivos llamados florescencias.

## **2.- VESÍCULAS DE CHLOROBBIUM: CLOROMAS**

(pág. 642 Brock)

- Lo poseen las bacterias verdes, son como puros bajo la membrana (que es no unitaria).
- Están rodeadas de una monocapa fina de 3-5 nm.
- Su rotura da subunidades que albergan el aparato fotosintético. Es el único caso en el que no está en la unidad de la membrana. Albergan a las bacterioclorofilas.

## **3.- CARBOXISOMAS**

- Lo tienen bacterias fotosintéticas como bacterias verdes, púrpuras, cianobacterias, quimiolitótrofos.
- Son cuerpos poliédricos de perfil hexagonal
- Poseen una monocapa fina (3.5 nm).
- La monocapa posee enzimas de fijación del CO<sub>2</sub>. Acumulan RUBISCO.

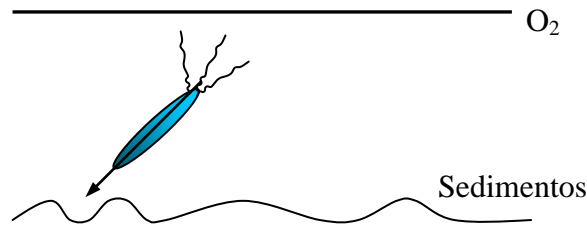
## **4.- MAGNETOSOMAS**

(pág. 92-93 Brock)

- Están en gran variedad de bacterias que se orientan según el campo magnético.
- Todas las bacterias son móviles y Gram-.
- Tienen aerotaxis, es decir están influenciadas por la concentración del O<sub>2</sub>.
- Los magnetosomas están orientados en hileras y suman su momento de dipolo. Si los magnetosomas fueran distintos no se alinearían.
- Están formados por magnetita o por grigita.
- Están rodeados por una membrana no continua con la membrana plasmática, esa membrana tiene lípidos y proteínas.
- Todas las bacterias tienen magnetotaxis que es la capacidad de alinearse pasivamente a lo largo del campo magnético cuando nadan.
- Pueden tener dos polaridades: una al norte y otra al sur (predominante).

La componente vertical selecciona la polaridad dominante y favorece la supervivencia de las que van a buenas zonas con sedimentos y las aleja de sustancias tóxicas

.- La mayoría son microaerofilicas, es decir se alejan de elevadas concentraciones de O<sub>2</sub>, el resto son anaerobias. En el ecuador existe la misma cantidad de bacterias con polaridad al N y al S.



### 5.- INCLUSIONES DE RESERVA

(pág. 92 Brock)

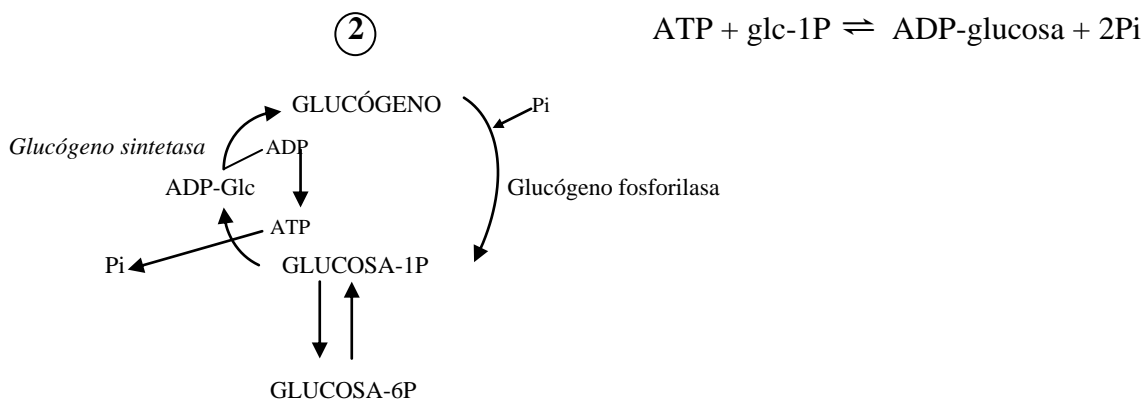
**a.- Compuestos no nitrogenados** Son polisacáridos de glucosa : almidón, glucógeno y PHB (exclusivo de procariotas)

1.- **Ácido Poli-β-hidroxi butirato (PHB)**. También existe los polihidroxi alcanatos: polihidroxi octanoico. Abundan en procariotas se usan para fabricar objetos de plástico.

2.- **Glucógeno/almidón**: acumulan uno u otro, pero hay excepciones, se acumula cuando falta nitrógeno, al no poder sintetizar proteínas, ácidos nucleicos, guardan una fuente de C hasta que tenga de nuevo nitrógeno.

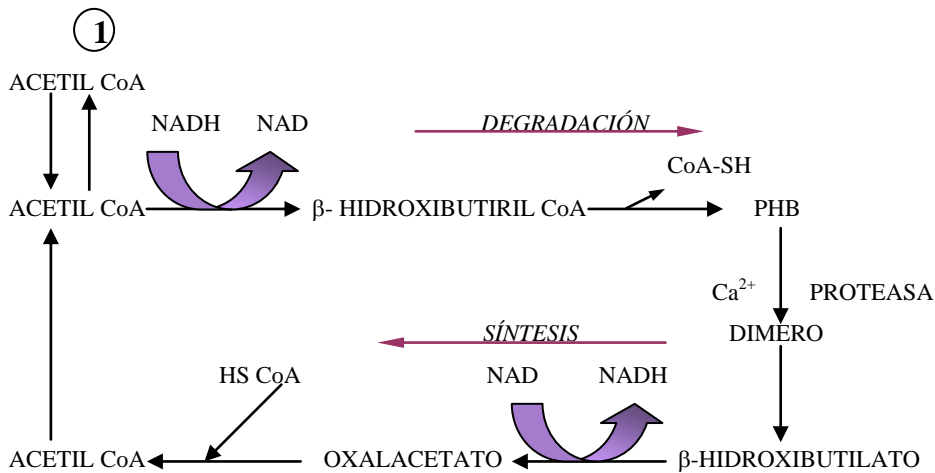
Forman gránulos en el citoplasma.

El glucógeno se sintetiza a partir de ADP-glc en procariotas. Luego el glucógeno es cortado por una glucógeno fosforilasa.



Ventajas de acumular en polímero:

- .- Se acumula C osmóticamente inerte
- .- El β-hidroxi butarato elimina un metabolito ácido.



### b.- Compuestos nitrogenados.

La cianofina en cianobacterias es una proteína que se acumula cuando llega la bacteria a fase estacionaria.

### c.- Gránulos de volutina.

Son polímeros de ortofosfato, son gránulos metoaromáticos, cambian de color, se ve rojos si se tiñen con colorante azul.

Se acumulan si falta S.

Si se añade  $\text{SO}_4^{2-}$  desaparecen, se cree que su función es la de ser reserva intracelular del fosfato.

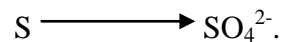
La síntesis consume ATP y la degradación lo produce.

### d.- Gránulos de azufre.

Aparecen en dos tipos de microorganismos :

- Bacterias rojas del S (usan  $\text{SH}_2$  como donador de electrones).
- Microorganismos filamentosos no fotosintetizadores (Ej. *Beggiatoa*).

El S es donador de electrones en las bacterias púrpuras:



El medio tiene sulfuro, cuando se ha usado todo el sulfuro el S almacenado pasa a sulfato, cuando el S pasa a sulfato desaparecen los gránulos.

*Beggiatoa* y *Thiothrix* tienen muchos gránulos de S elemental.

**NÚCLEO. REGIÓN NUCLEAR. NUCLEOIDE.**

(pág. 99-101 Brock)

Para observar el núcleo se usan técnicas de criofractura. Se ve una región granular que ocupa el 50% o menos de volumen centrado y uniforme. Usando el microscopio el mayor problema que existe es la fijación. Para la tinción con colorantes básicos se tiene que tratar antes con ribonucleasas.

Por fluorescencia es fácil verlos, usando tinción de DAPI.

El DNA está muy compactado con una elevada densidad 20-50mg/ml. Cuando la bacteria está en crecimiento activo podemos encontrar 2-4 núcleos porque estos se dividen más rápidamente que la célula. Cuando no se dividen existe un único núcleo por célula.

**CROMOSOMA BACTERIANO.**

**Datos genéticos:** Existe un único grupo de ligamiento que es circular, todos los genes están ligados formando un cilindro, a este grupo se le llama *genóforo* que está en el genoma de eubacterias y arqueobacterias. Se marca la célula con timidina tritiada y posteriormente se lisan las células con cuidado, el DNA mezclado con otros compuestos se trata con proteasas bajo condiciones concretas para eliminar esas proteínas. El DNA queda pegado a un celofán. Se observa una fila larga circular de una longitud de 1mm (unas 1000 veces más que la longitud de la célula).

Sabiendo la cantidad de DNA y que está en doble hélice decimos que hay  $5 \times 10^6$  pb en 1mm. El DNA es 100 veces más que al de una mitocondria y 10 veces más que al de un cloroplasto.

El DNA está asociado a proteínas no histónicas pero parecidas, una mayoritaria es la  $H_1$  (dimérica). Son proteínas del tipo de las histonas

Tiene un superenrollamiento negativo, tiene un déficit de  $-0.05$  vueltas por cada 10pb, le faltan 5 vueltas por cada 1000 bases. **L** es el **índice de enlace**, es el nº de veces que una fibra gira alrededor de la otra a lo largo de la molécula. Cuando se unen las proteínas se altera este valor.

El DNA tiene proteínas unidas con un superenrollamiento debido al déficit de vueltas, en los bucles el nº de nucleótidos por vuelta sería ya que ese valor está modificado por la asociación de proteínas, al eliminar esas proteínas queda un DNA superenrollado con un nº de unidades de nucleótidos/vuelta. Al cortar una de las dos

bandas da un DNA relajado, no superenrollado, en un  $n^\circ$  de 10.6 nucleótidos/vuelta si por ejemplo tiene 1115 nucleótidos:

$$L_0 = N/(n/v) = 1115/10.6 = 124$$

Si lo hacemos cuando la molécula esta superenrollada  $L_1 = 1115/10 = 120$

$$L_1 - L_0 = 4 \text{ superenrollamientos.}$$

La **topoisomerasa I** (helicasa) da DNA relajado a partir de superenrollado. (“desenrolla” el DNA).

La **topoisomerasa II** (o girasa) da DNA superenrollado. Añade bucles.

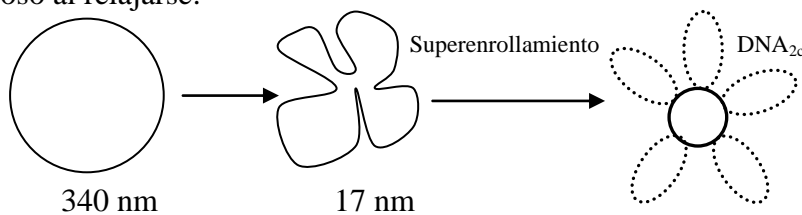
La adición de proteínas en la célula puede modificar el  $n^\circ$  de nucleótidos/vuelta en cada célula.

### CROMOSOMA “IN VIVO”.

Tiene que tener una organización supramolecular.

Se intenta obtener el DNA, para ello se trata con lisoenzima, detergente neutro (para eliminar Rna y proteínas) y una concentración concreta de sal (1M de NaCl) y se obtiene una material menos viscoso ya que está empaquetado y que pesa mucho, sedimenta fácilmente. Estas estructuras sedimentan a baja velocidad, a 25° se obtiene estructuras de 1200 S aproximadamente. Son **genóforos** replegados con mucho RNA y proteínas, sobre todo RNA-plimerasa

Con el MEB se ven los nucleótidos de las células vivas; con el MET se extiende y ocupa una mayor superficie, se ve un núcleo central y asas o lazos que es DNA superenrollado, tratando esto con agentes desnaturalizantes de proteínas el DNA se hace viscoso al relajarse:



El genóforo tiene asas de DNA cada una enrollada en una superhélice y unidos todos a una masa central de RNA

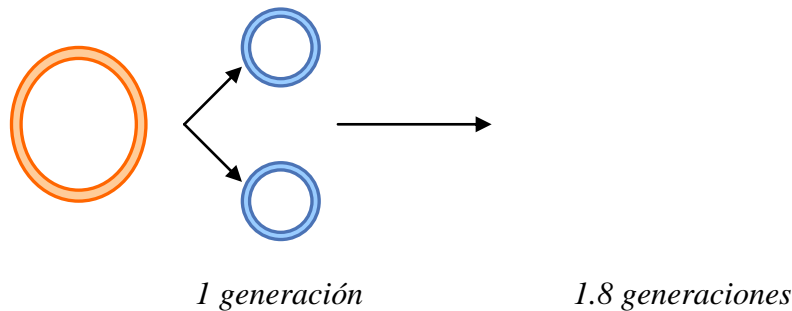
Los dominios son independientes, las asa pueden abrirse, genes que se están expresando están en el extremo del asa. Las asas son dinámicas, los dominios son independientes pero dinámicos.

Con otros métodos a baja concentración de sal o a baja temperatura (4°C), por ejemplo, nos salen trozos de mayor tamaño, se cree que el DNA está pegado a la

membrana y al decantar llevan trozos del DNA, se ha estimado 28 sitios de unión a la membrana. No se sabe si están implicados en la replicación o están implicados en la segregación. Se sabe que Ori C está unida a membrana. En células que ya han sintetizado DNA no existe genóforos replegados unidos a membrana. “In vivo” el genóforo está suelto. Antes de la replicación el genóforo está unido a la membrana.

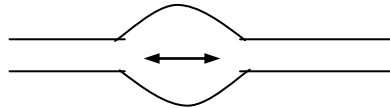
## REPLICACIÓN

Cairns marcó con timidina tritiada de 1 a 8 generaciones.



La replicación empieza en un punto de la circunferencia del genóforo y las horquillas de replicación se desplazan en sentidos opuestos hasta que se encuentran a 180° del origen, en un punto llamado termino.

Antes de terminar el ciclo de replicación puede comenzar otro. La es replicación bidireccional.

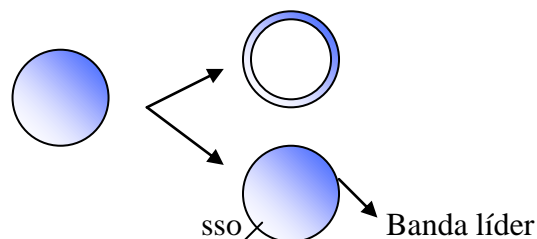


Existe una región (Ori C) reconocida por proteínas y es donde comienza todo. No todos los DNA procariontes se replican así, existe replicación por circulo rodante. Existen 2 variantes que son la que siguen plásmidos y fagos.

1.- Plásmidos: Rec reconoce el sitio de unión de corte en una banda y une los extremos finales. Permite que la DNA-polimerasa forme la banda líder.

La banda líder que se convertirá en DNA<sub>2c</sub> comenzando por sso.

Es una replicación asimétrica.





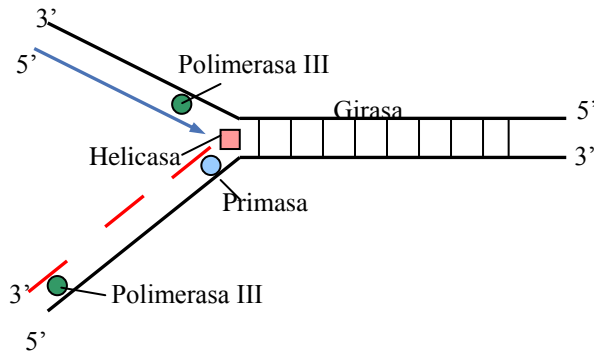
2.- Fagos: Por ejemplo el fago  $\lambda$  en replicación tardía. No desplaza la banda líder original sino que siguen saliendo, se forman *concatémeros*, el DNA se corta y posteriormente se van acumulando en la cabeza del fago.

Una banda parental sirve como molde y la otra sólo se usa una vez. Es replicación asimétrica.



## BASES MOLECULARES DE LA REPLICACIÓN.

(pág. 202 Brock)



La replicación avanza en dirección  $3' \rightarrow 5'$ . La DNA-polimerasa I hidroliza RNA y rellena con DNA.

- .- **ssb**: Proteínas de unión a DNAs que estabilizan la cadena sencilla.
- .- **Primasa**: Es la proteína formadora de cebadores
- .- **Girasa**: Evita el superenrollamiento positivo al abrirse la cadena por la helicasa.
- .- La **DNA-polimerasa III** tiene actividad exonucleasa  $3' \rightarrow 5'$ . Así puede corregir sus errores.
- .- La primasa sintetiza un RNA cebador que sirve para iniciar la replicación. Este luego es eliminado por la DNA-polimerasa I (actividad exo.  $3' \rightarrow 5'$  y  $5' \rightarrow 3'$ ).
- .- Para mantenerse abierta la doble hélice de DNA se necesita que se unan las SSB, los cuales estabilizan el complejo.

### \* **Iniciación:**

Comienza en Ori c (258pb) que es una región del DNA, es el segmento mínimo que clonado en un vector lo hace replicarse. Tiene diferentes zonas: 1,2 y 3 son zonas de 13 pb y comienzan por GATC, antes de los tres segmentos existen zonas ricas en AT que son fáciles de abrir.



Luego existen 5 cajas de DNA llamadas DNA A, existe entre 9-14 GATC muy conservadas algunas en su posición (8 de ellas).

La proteína dna A se une a las cajas y organiza el replisoma y se abre en la región rica en pares AT.

Se forma el replisoma y entra la DNA B (helicasa) y el DNA C (ATPasa) uniéndose a la región rica en AT. Se puede abrir la cadena, el DNA C posiciona al DNA B, hidroliza ATP y se separa. Después se une SSB para mantenerlo abierto.

La primasa forma el DNA cebador de RNA en ambas cadenas. Luego entra la DNA-polimerasa III que sintetiza la cadena guía, también necesitan girasa y helicasa.

## ENDOSPORAS Y ESPORULACIÓN

(pág. 95 Brock)

### ESPORULACIÓN

La esporulación conduce a la formación de una célula nueva dentro de una célula madre con propiedades diferentes a su progenitora. Es una diferenciación que necesita síntesis y transporte de macromoléculas. La espora es un cuerpo refráctil resistente a agentes químicos, físicos, etc., carecen de metabolismo activo. La formación de una espora posee varios estadios.

Las endosporas las forman bacterias Gram+ cuyo hábitat es el suelo, suelen formarlas quimioheterótrofos. El suelo presenta condiciones extremas y cuando las condiciones no son favorables esporulan.

Al microscopio aparecen refringentes ya que tienen gruesas cubiertas difíciles de teñir.

Las endosporas se forman dentro de la célula vegetativa y cada célula da una única endospora tras la cual existe lisis celular.

CRIPTOBIOSIS: Es el estado metabólico de las endosporas. Presenta un reposo total pero no están muertas, existe latencia.

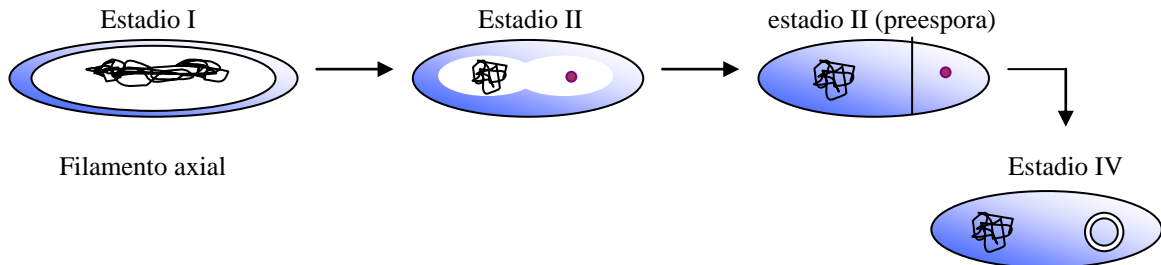
### FORMACIÓN DE LA ENDOSPORA:

En el género *Bacillus* el proceso dura 8 horas aproximadamente.

El proceso que dispara la esporulación es la escasez de nutrientes, Se inicia cuando la célula acaba una fase de crecimiento e inicia una fase estacionaria. Ciertas células crecen en fase exponencial con un metabolismo fermentativo, cuando agotan

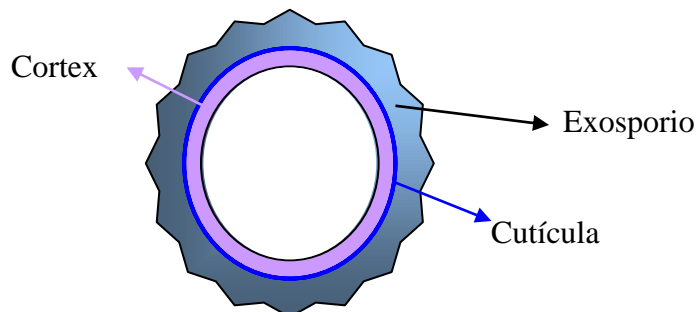
los nutrientes comen los desperdicios y pasan a un metabolismo oxidativo, este cambio produce la esporulación.

En esta fase una parte de las células producen esporulación, en algunas se da la duplicación del DNA, aparecen dos moléculas de DNA formando el filamento axial. Al principio la célula parece poseer dos núcleos.



Luego se produce un septo asimétrico, una pequeña porción del citoplasma engloba una molécula de DNA y el resto queda en el otro extremo. Éste septo sólo lo forma la membrana, no interviene la pared celular. A continuación la célula grande engloba a la pequeña rodeándola con la membrana, al final la célula pequeña tiene una doble membrana, esto es la *preespora*, aquí ya es irreversible el proceso y se formará la endospora.

Las distintas capas que son sintetizadas y que rodean a la endospora son:



(se cree que es el DPA el que da la resistencia al calor)

**1.- Cortex:** Se sitúa entre las dos membranas de la endospora. Es peptidoglicano que presenta un menor nivel de entrecruzamiento que el normal. No lleva unidos aminoácidos, sólo tiene L-ala, posee un bajo % que lleve el tetrapéptido, por lo que es más laxo. Un 55% del peptidoglicano es ácido murámico formando una lactama (anillo), un 30% es NAM y tiene el tetrapéptido y sólo el 15% es murámico con L-Ala.

**2.- Cubierta de la espora:** es la estructura que rodea a la corteza, es densa a los electrones. Está constituida por proteínas que puede ser el 80% del total de las proteínas (30-60 del peso seco total de la célula), las proteínas son semejantes a la queratina.

**3.- Exosporio:** Aparece en ocasiones, es más laxo y de naturaleza lipídica, es típico de ciertas especies.

Una vez formada la endospora se lisa la célula vegetativa y queda libre en el medio.

Tiene un bajo nivel de hidratación, mientras que las células normales tienen un 70-90% de agua las endosporas poseen menos del 15% de agua. Esto da resistencia.

Para conseguir esto eliminan agua sintetizando el cortex, ya que la síntesis del peptidoglicano consume mucha agua, por otra parte durante la formación de la endospora se produce la entrada masiva de iones  $\text{Ca}^{2+}$  al interior, además paralelamente se da la síntesis de una molécula que es el **ácido dipicolínico**, se forma en una vía lateral a la síntesis de aminoácido y ocupa mucho sitio dentro de la endospora formando complejos con  $\text{Ca}^{2+}$ . En la síntesis de este complejo se consume mucha agua.

Según se forma la endospora va apareciendo la refringencia, paralelamente se produce termorresistencia y puede ser del 15-20% del total del peso seco. Son procesos que van en escalera.

Se sintetizan proteínas específicas que no están en la célula vegetativa, son las proteínas SASP (proteínas pequeñas ácido solubles). Estas proteínas son exclusivas de las endosporas y se cree que por una parte se unen al DNA de la endospora protegiéndolo de la sequedad y otras condiciones posibles, por otra parte sirven de fuente de carbono y energía cuando la célula germina.

En el interior celular hay una bajada del pH, en la endospora hay un pH del 5.5-6 mientras que en la célula vegetativa es del 6.5-7. No se sabe si cumple una función o es por la presencia masiva del ácido dipicolínico.

Quitando la fuente de N se inicia la esporulación, si tras 2-3h se añade de nuevo N se revierte el proceso y la célula vuelve a célula vegetativa. Pero si pasan 6h tras la eliminación del N la célula está obligada a esporular. La espora es una célula muy deshidratada, sin actividad metabólica, en la que desaparecen los citocromos y aparecen otros sistemas de transporte de electrones, posee pocos ribosomas y su RNA.

### **SÍNTESIS DE ANTIBIÓTICOS:**

Asociado a la esporulación están los antibióticos que inhiben el crecimiento o mata a otros microorganismos.

No se sabe la función de estos antibióticos, puede que sea para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, esto por una parte es evidente, pero si están

esporulando quiere decir que no deben existir microorganismos. Puede que sea otra función y que no esté determinada.

Existen distintos tipos de antibióticos asociados a esporulación:

- 1.-**Edeinas**: son péptidos lineales que inhiben la síntesis de DNA.
- 2.-**Bacitracinas**: son péptidos cíclicos que inhiben la síntesis de la pared celular.
- 3.-**Gramicilina, polimixina, tirocidina**: son antibióticos que afectan al normal funcionamiento de la membrana.

Todos presentan D-aminoácidos que no es normal en otras clases de células, y poseen aminoácidos modificados. Esto se debe a que en su síntesis no usan ni RNAt ni ribosomas, sino que van uniendo un aminoácido tras otro.

Algunas especies crean la formación del **Cristal Parasporal**, es una estructura poliédrica asociada a la endospora dentro de la célula vegetativa, no se sabe ni su función ni como se forma. La teoría más aceptada es que son desechos del material de la cubierta de las esporas. Es posible usarlo como producto insecticida, se intenta su uso como insecticida biológico, que será más efectivo y no daña a las plantas. La especie donde más se ha estudiado este cristal es en *Bacillus thuringiensis*.

### CONTROL GENÉTICO DE LA ESPORULACIÓN:

Existen al menos 200 genes que controlan el proceso, se llaman **genes SPO**. Se dejan de expresar genes que funcionan normalmente en la célula vegetativa y funcionan otros que se expresan tanto en la endospora como en la célula vegetativa.

La célula usa factores sigma específicos de la esporulación, en *B. subtilis* se ha visto diferentes  $\sigma$ :  $\sigma^{55}$ ,  $\sigma^{37}$ ,  $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^{28}$ . En condiciones de ayuno se expresan sobre todo  $\sigma^{37}$  y  $\sigma^{32}$ . La RNA-polimerasa se une por su unidad  $\sigma$  al promotor posibilitando el inicio de la transcripción,  $\sigma$  reconoce secuencias (-35, -10) de los promotores. Los factores  $\sigma$  reconocen los genes necesarios para la esporulación. Al menos existen 4 factores  $\sigma$  específicos, dos funcionan en la célula vegetativa y los otros dos en la endospora, su acción es secuencial por lo que la esporulación transcurre de un modo ordenado, se van transcribiendo unos genes dentro de otros.

Se transcriben unos pocos genes como anti- $\sigma^{55}$  y  $\sigma^{29}$ , éste último reconoce promotores de muchos genes de esporulación y la célula comienza a esporular.

**GERMINACIÓN DE LAS ENDOSPORAS:**

Cuando la endospora encuentra un ambiente adecuado germina. Las endosporas pueden estar latentes durante miles de años, al germinar lo hacen de igual forma que si fueran una endospora reciente. La germinación se da por etapas:

**1.- Etapa de activación:** No produce cambios físicos aparentes. Se puede inducir artificialmente por choque térmico (exposición durante determinado tiempo a altas temperaturas aunque siempre subletales), por almacenamiento durante tiempo prolongado a 4°C, por tratamiento con ácidos o álcalis, etc. Esta etapa es **reversible**, vuelve al estado de latencia, pero si entra en contacto con un agente germinante se hace irreversible y es el punto de inicio de la germinación.

**2.- Inicio de la Germinación:** Los germinantes pueden ser: azúcares, aminoácidos, ciertos iones o un tratamiento mecánico de la endospora. Desaparece la refringencia, se hace oscura. Comienza un gran metabolismo activo dentro de la endospora pero no existe síntesis de proteínas, se realiza a expensas de enzimas y proteínas. Pierde la capacidad de resistencia, libera sustancias solubles como DPA-Ca<sup>2+</sup>, fragmentos de peptidoglicano del córtex, etc. Es una etapa **irreversible**. Desde la germinación hasta el final tarda unos minutos.

**3.- Hinchazón:** La célula comienza a hincharse al entrar agua en su interior, se están destruyendo la cubierta que rodea a la endospora, al destruirse el cortex entra el agua y sale el ácido dipicolínico cálcico. Se comienza a sintetizar la pared celular, se rompe la capa externa y aparece una célula vegetativa normal dividiéndose.



**TEMA 9.- LA CÉLULA EUCARIOTA.**

Los microorganismos eucariotas son: algas, hongos y protozoos.

**PARED CELULAR DE ALGAS**

Es celulósica, son polímeros de glucosa en  $\beta 1 \rightarrow 4$ . También hay hemicelulosas que son polímeros ramificados de glucosa y otros azúcares. También tenemos pectina.

La mezcla de los tres da consistencia de gel, pero la composición depende de la incorporación de xilanos, menanos, etc. Puede haber deposición de  $\text{CaCO}_3$  o de sílice (Diatomeas).

**PARED CELULAR DE HONGOS**

El polímero estructural es la quitina ( $\beta 1 \rightarrow 4$  glu NAc), esto da rigidez, el componente mayoritario es la glucosa, y la sustancia cementante son los menanos (menoproteínas).

Los componentes antifúngicos están dirigidos a la inhibición de la síntesis de estos compuestos que forman la pared celular.

Los protozoos carecen de pared, tienen inclusiones de calcio o sílice.

.- Flagelos y cilios: en su formación está involucrada la tubulina. El flagelo posee 9 fibras dobles periféricas y 2 fibras centrales.

El movimiento de los flagelos es como el de un látigo, mandan la onda, lo que permite el movimiento.

En el movimiento ameboide está involucrada la actina, emitiendo los pseudópodos. Necesita una superficie sólida.

**TEMA 10.- METABOLISMO MICROBIANO: LA OBTENCIÓN DE ENERGÍA.****1.-CONCEPTOS BÁSICOS DE ENERGÉTICA MICROBIANA.**

(pág. 151 Brock)

**EL METABOLISMO.**

Los seres vivos dirigen las reacciones químicas hacia la síntesis de macromoléculas que formarán parte de la biomasa, que en último término dará el crecimiento de los microorganismos. El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que se dan dentro de una célula. Es un flujo energético.

- Visión general del metabolismo en fotocopia. (pág. 110 Brock)

El ser vivo es un sistema abierto que intercambia materia y energía con el medio externo, materia que sirve para construir estructuras celulares. Este proceso se llama ANABOLISMO O BIOSÍNTESIS. Para que se de hace falta energía, esta energía se obtiene del CATABOLISMO y parte se usa en el movimiento. Otra parte de la energía y de la materia se expulsa al exterior como producto de deshecho.

Según la obtención de energía los organismos se dividen en **fitótrofos** (obtienen la energía de la luz) y **quimiótrofos** (la obtienen de reacciones químicas).

Según la obtención de materia tenemos a los **litótrofos (=autótrofos)** que usan la materia inorgánica y a los **organótrofos (=heterótrofos)** que usan la materia orgánica.

Podemos distinguir **4 tipos nutricionales** de microorganismos:

	<b>Fuente de energía</b>	<b>Fuente de carbono</b>
1.- FOTOAUTÓTROFOS:	Luz	CO <sub>2</sub> (Plantas)
2.- FOTOHETERÓTROFOS:	Luz	Comp. orgánicos
3.- QUIMIOAUTÓTROFOS:	Comp. orgán/inorgán	CO <sub>2</sub>
4.- QUIMIOHETERÓTROFOS:	Comp. orgánicos	Comp. orgánicos (Animales)

**Composición química de la célula eucariota:**

La célula eucariota está compuesta por un 90% de agua y un 10% de elementos como: C (50%), N(12%), O, H, Elementos trazas (Fe<sup>2+</sup>, P, S, Mg).



Fotocopia. Cuadro del % en peso seco (tabla 4.1 Brock), moléculas por célula y nº de clases diferentes.

### Energía:

Es la capacidad para realizar un trabajo. En biología se usa la energía de la luz y la de compuestos químicos. El resto no se usa.

La energía de las reacciones químicas es la que lo realiza todo ya que la de la luz también se transforma en energía química.

G es la energía libre o energía que se puede usar en la realización de un trabajo. G se toma con referencia a un valor estándar a pH=7, T=25°C y concentración de 1M donde G se representa como  $G_0'$  (energía libre estándar).

En una reacción química tenemos dos reactivos que reaccionan dando los productos, la reacción va a tener un cambio energético dado por H y G al que llamamos incremento ( $\Delta$ :  $\Delta G$  e  $\Delta H$ ).  $\Delta G$  e  $\Delta H$  es igual a la energía de los productos menos la energía de los reactivos. Cuando la energía libre es mayor que cero la reacción es endergónica y necesita energía para darse, pero si  $\Delta G$  es menor de cero la reacción es **exergónica** y desprende energía, es espontánea, el equilibrio está desplazado hacia los productos. A los seres vivos les interesa que la reacción sea exergónica.

### REACCIONES REDOX (pág. 121 Brock)

Son reacciones con oxidación (pérdida total o parcial de electrones y protones). Las fuentes químicas de energía pierden electrones y protones, se oxidan y dan los productos de desechos reducidos parcial o totalmente.

La tendencia de un compuesto a ceder  $H^+$  varía. Una medida de la tendencia a perder o tomar electrones viene dada por el potencial electroquímico ( $E^{\circ}$ ). Para cada sustancia se pone pares oxidado/reducido, **pares redox**.

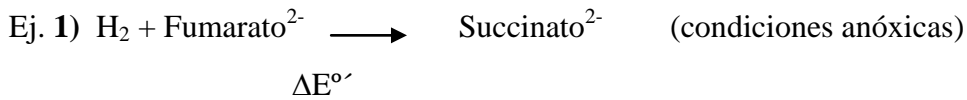
Ej.  $E^{\circ}(\text{CO}_2/\text{Glucosa}) = -0.43 \text{ V}$  (Grande y electronegativo)

$E^{\circ}(2\text{H}^+/\text{H}_2) = -0.42 \text{ V}$

$E^{\circ}(\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) = +0.82 \text{ V}$  (Grande y electropositivo)

Cuanto más **electropositivo** sea mejor reductor, mejor fuente de energía (*Reductores fuertes*). Cuanto más **electronegativo** sea mejor oxidante, tomará los electrones reduciéndose. (Página 122 Brock).

Los electrones irán desde azúcares como glucosa hasta los aceptores finales que serán los oxidantes.



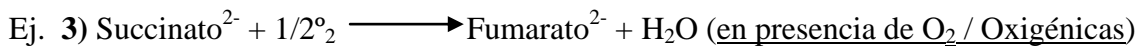
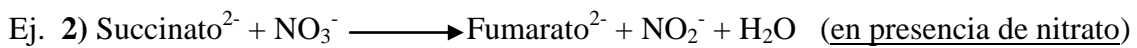
$\Delta E^{\circ'} \rightarrow \Delta G^{\circ'} = -n \cdot F \cdot \Delta E_0' = -86 \text{KJ} \rightarrow$  Energía liberada capaz de formar *enlaces químicos*. **Trabajo útil.**

El Fumarato oxida al  $\text{H}_2$  reduciéndose y dando la forma reducida que es el succinato. El  $\text{H}_2$  es usado por unas bacterias dando energía.

$\Delta G^{\circ} < 0 \rightarrow$  OCURRE

$\Delta G^{\circ} > 0 \rightarrow$  NO OCURRE

En condiciones anóxicas se da estas reacciones y los electrones van desde el  $\text{H}_2$  al fumárico o puede ir al nitrato.



### TRANSPORTADORES INTERMEDIARIOS DE ELECTRONES.

Los electrones pasan del primer donador a un transportador y de aquí al aceptor final. *Donador 1º*  $\rightarrow$  *Transportador*  $\rightarrow$  *Aceptor final*.

1.- Fuente de energía: La luz solar o comp. químicos como glucosa,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{S}^0$ ,  $\text{H}_2$ , etc., ceden electrones dando energía (ATP) a los transportadores.

2.- Transportadores de energía: Pueden ser: en solución el  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{FAD}$ , y acoplados a membrana como los citocromos.

$E_0'(\text{NAD}^+/\text{NADH}) = -0.32 \rightarrow$  Buen donador.

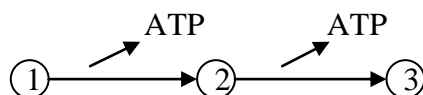
Estos transportadores ceden los electrones a los aceptores finales.

3.- Aceptores finales: Pueden ser:

.- Oxígeno en la *respiración aeróbica*

.-  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^-$  en la *respiración anaeróbica*.

.- Compuestos orgánicos en la *fermentación*.



## ENLACES RICO-ENERGÉTICOS

La energía que se libera de las reacciones REDOX se conserva mediante enlaces rico-energéticos por la unión de fosfatos por enlaces fosfodiésteres → ATP. Son enlaces éster con fosfato (caso del ATP) o con azufre (caso del CoA)

El ATP es el más universal pero existen otros de alta o baja energía como el ADP (alta energía) o el AMP (baja energía). (Cuadro en fotocopias).

Tiene alta energía de hidrólisis.

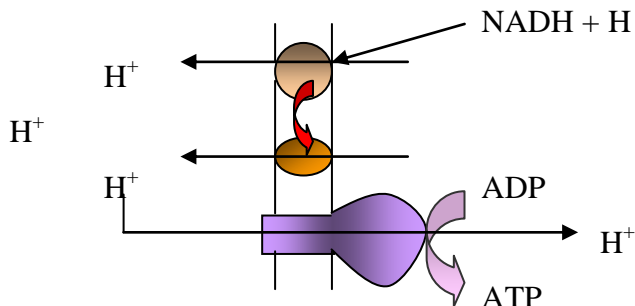
## MECANISMO DE FOSFORILACIÓN.

Existen 3 mecanismos:

**1.- Fosforilación a nivel de sustrato.-** Se da una hidrólisis, se cede el fosfato para formar ATP, hay transferencia del fosfato.



**2.- Fosforilación oxidativa.-** Ocurre a nivel de membrana, lejos de la ruta metabólica. Por transporte de electrones, interviene una ATP-SINTETASA que aprovecha un gradiente de  $\text{H}^+$  para formar ATP.



**3.- Fotofosforilación.-** Fotosíntesis usando los pigmentos.

## 2.- OBTENCIÓN DE ENERGÍA EN QUIMIOHETERÓTROFOS

(pág. 126 Brock)

Oxidación de compuestos orgánicos y conservación de la energía como ATP:

Hay dos grandes grupos de rutas metabólicas: Fermentación y respiración.

**1.- Fermentación:** Los procesos REDOX se llevan a cabo en *ausencia de un aceptor final externo de electrones*, el aceptor de electrones es un producto endógeno. La oxidación se realiza hasta la formación de compuestos orgánicos parcialmente reducidos: etanol, acético, etc. (Ej. de glucosa a etanol).

La síntesis de ATP se da por *fosforilación a nivel de sustrato*.

**2.- Respiración:** El *aceptor final de electrones es un compuesto externo, puede ser oxígeno*, en la respiración aeróbica, u otro compuesto inorgánico en la anaeróbica.

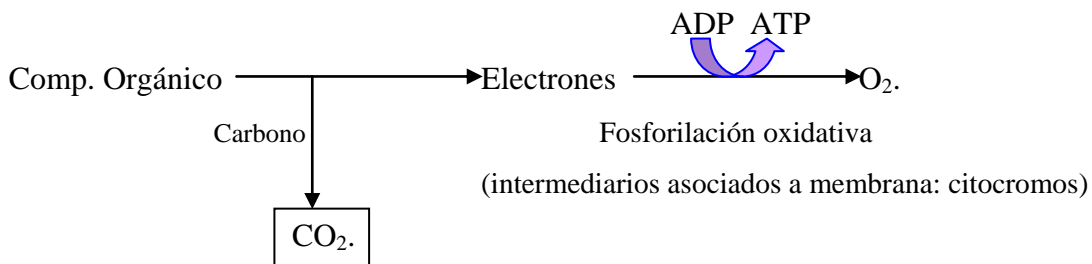
Existe una oxidación completa. ( $\text{glc} \rightarrow 6\text{CO}_2$ )

La síntesis de ATP se da por *fosforilación oxidativa por la cadena de transporte de la membrana* (fuerza protón-motriz).

En la **fermentación** hay un flujo de  $e^-$  desde el donador de  $e^-$  a un intermediario dando un enlace rico-energético que será el que ceda el fosfato al ATP para formar compuestos orgánicos oxidados (pirúvico, éste es el aceptor final de  $e^-$ ), este compuesto puede seguir reduciéndose dando productos a medio oxidar como el láctico, etanol,  $\text{CO}_2$ , etc.

Intervienen los transportadores de  $e^-$  desde el intermediario al producto final.

En la **respiración** hay un flujo de carbono y electrones (flujo que está relativamente separado).

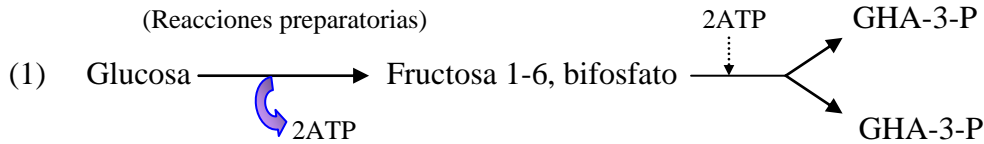


## 2.1 FERMENTACIÓN

La fermentación microbiana posee dos rutas básicas: la *vía glicolítica o ruta de Embden-Meyerhoff* (glucolisis) y la *ruta de Entner-Doudoroff*.

### **A) VÍA DE LA GLUCOLISIS**

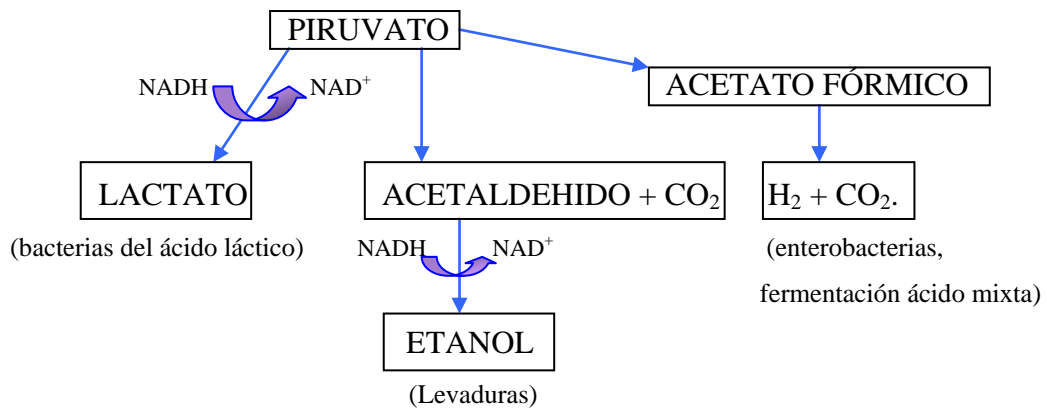
La vía de la glucolisis es la que se sigue al realizar la fermentación de la glucosa. (oxidación) (toda fermentación de glucosa tiene en común esta vía). Posee 3 etapas: una es la activación de la glucosa, luego se oxida éste azúcar, (ambas etapas se representan en la reacción 1) y por último se da la fermentación (2). La activación de la glucosa gasta dos ATP.



En estas primeras reacciones se preparan los compuestos.

(2) La GHA-P-Dhasa lleva los electrones al  $\text{NAD}^+$ . Luego por fosforilación acoplada a sustrato se sintetiza ATP. Es un 2º grupo que da piruvato y se sintetiza ATP. Esto es la glucólisis.

A partir del pirúvico pueden darse las reacciones fermentativas dando los productos de deshecho finales:



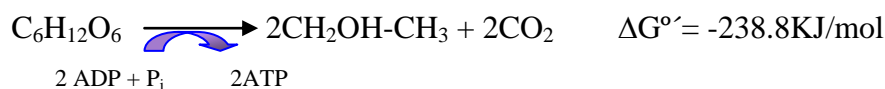
En esta fase se da reducción, el piruvato se reduce y el NADH se oxida recuperando los  $\text{NAD}^+$  usados anteriormente.

RESUMEN ENEGÉTICO: (fotocopias)

- .- Fermentación etanólica:  $\text{Glc} \rightarrow 2 \text{ etanol} + 2\text{CO}_2$ .
- .- Fermentación láctica:  $\text{Glc} \rightarrow 2 \text{ láctico} + \text{H}^+$ .
- .- Fermentación ácido-mixta:  $\text{Glc} \rightarrow \text{acetato} + \text{lactato} + \text{H}_2 + \text{CO}_2 + 2\text{H}^+$ .
- .- Fermentación ácido-mixta:  $\text{Glc} \rightarrow \text{acetato} + \text{lactato} + \text{formato} + 3\text{H}^+$ .

La fermentación etanólica tiene una  $\Delta E^{\circ'} = -238.8\text{KJ/mol}$  de glc. Fermentada. Por cada mol de ATP se necesitan 31.8KJ y se forman 4 ATP en la fermentación, queda por tanto:

1 glc.  $\rightarrow 2\text{ATP} = -63.6\text{KJ}$ .



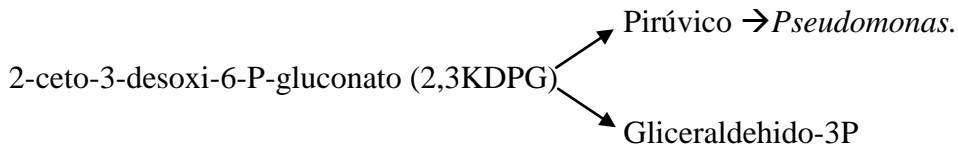
$2\text{ATP} = 2 \cdot (-31.8\text{KJ/mol}) = -63.6 \text{ KJ/mol}$ . Este valor respecto a  $\Delta G^{\circ'} = -238.8\text{KJ/mol}$  es un 27%, sólo se usa ese 27% que es la eficiencia.

Los coenzimas que se reducen son los que se usan para la fermentación (reducir el pirúvico). Si no existe conversión rápida de los reductores a oxidantes ( $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADH}$ ) la reacción se cortaría.

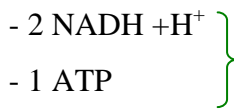
#### RUTAS ALTERNATIVAS A LA GLUCOLISIS EN LA FERMENTACIÓN:

##### B.- RUTA DE ENTNER-DUOBOROFF (Ruta del KDGF).

Ej. *Pseudomonas sp.* (fotocopias)



El rendimiento neto es menor que en la glucolisis:



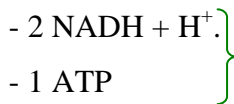
##### C.- RUTA DE LAS PENTOSAS FOSFATO.

Es simultánea a la glucolisis. Se originan intermediarios típicos de la biosíntesis de macromoléculas aunque también pasa la glucosa a pirúvico.

Es exclusiva de los microorganismos.

Ruta (fotocopias). La glucosa pasa a pirúvico transformándose en xilulosa-5-P y en ribosa-5-P, y posteriormente en GHA-3-P.

El rendimiento también es menor que en la glucolisis:



## 2.2 RESPIRACIÓN

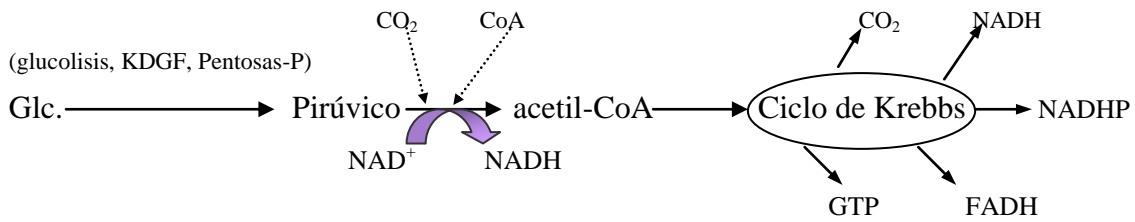
Se da una oxidación completa de los átomos de carbono.

El aceptor de electrones puede ser de tres tipos. El compuesto orgánico da un flujo de carbono que lleva hasta  $\text{CO}_2$ , cuando el aceptor de  $e^-$  es el  $\text{O}_2$  tenemos la **respiración aerobia** si es un compuesto orgánico (succinato, fumarato) o inorgánico ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{CO}_2$ , etc.) la respiración es **anaerobia**.

También existe un flujo de electrones por una ruta diferente al flujo de carbono (no como en la fermentación).

##### A.- FLUJO DE CARBONO: CICLO DEL ÁCIDO CÍTRICO. (pág. 136 Brock)

Comienza con el ácido pirúvico, se descarboxila, oxida y condensa con CoA, dando acetil CoA (2 átomos de C), se condensa y da el citrato (5 carbonos).



Se forma 2GTP, con el flujo se ha generado 6 CO<sub>2</sub> y NADH que son transportadores de electrones.

#### Rendimiento:

- 4 NADH	} 15 ATP
- 1 FADH	
- 1 GTP	

El GTP por fosforilación a nivel de sustrato pasa a ATP

TOTAL: 38 ATP por glucosa.

Existe una oxidación total de la glucosa y pirúvico a CO<sub>2</sub>.

En la respiración hay un 43% de eficiencia (fotocopia), el resto se pierde por calor, mientras que en la fermentación más eficaz hay un 32% de eficiencia (ferm. Láctica). Se produce poco ATP, 2 ATP frente a los 38 de la respiración.

Termodinámicamente hablando la eficiencia es alta, buena.

El crecimiento de un microorganismo es proporcional al ATP que se forma, crecimiento y producción de biomasa. En la fermentación hay menos biomasa, menor cantidad total de microorganismos.

Las levaduras, dependiendo de si existe o no oxígeno, pueden fermentar o pueden respirar. Tendremos más o menor levaduras según el ambiente.

#### **B.- FLUJO DE ELECTRONES: CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES.**

(Pág. 130 Brock)

Se da vía de la fosforilación oxidativa (transporte de electrones). Los coenzimas dan ATP. El flujo se da por transportadores de electrones o intermediarios asociados a membrana. Son proteínas que catalizan reacciones REDOX.

.- Los sistemas de transportadores electrónicos están constituidos por:

- NADH deshidrogenasa (cara interna de la membrana plasmática).
- Flavoproteínas (FMN, FAD) recogen H<sup>+</sup> y e<sup>-</sup> de la NADH Dhasa.
- Proteínas ferrosulfuradas no hémicas (FeS).
- Citocromos (el Fe está dentro de un grupo hemo).
- Quinonas, no son proteínas, sirven de enlaces son hidrofóbicas.

El proceso consiste en un conjunto de transportadores de electrones dispuestos vectorialmente (existe un transporte vectorial de electrones, se ceden siguiendo la torre de caída de los electrones).

En la disposición alternan transportadores de electrones con otros de  $e^-$  y  $H^+$ . al final se genera un gradiente de protones a través de la membrana. la parte interna queda con  $OH^-$  (básica) y la parte externa queda positiva (ácida).

Una Dhasa de nicotinamida toma los electrones y protones y los cede a una flavoproteína que los cede a su vez a proteínas ferrosulfuradas. Los  $H^+$  quedan fuera. La proteína FeS cede los  $e^-$  a las quinonas y éstas toman los protones de fuera (las FeS sólo ceden los electrones), las quinonas ceden los electrones de forma gradual, al principio uno y después otro,  $QH_2$  cede los electrones al citocromo  $bc_1$ .

El cit  $bc_1$  cede los  $e^-$  al cit c que pasa los  $e^-$  a la oxidas terminal (cit  $aa_3$ ) que hace la transferencia de  $e^-$  desde un medio de  $O_2$  para dar  $H_2O$  (reduce el oxígeno).

Fuera se acumulan protones y se van perdiendo del interior por lo que el medio interno se alcaliniza.

El gradiente de protones se usa para sintetizar ATP. en la membrana los transportadores no están ordenados, existe fluidez de membrana, esto se da cuando choquen. Esta cadena de transporte se da con la respiración aerobia.

Hay tres puntos de conservación de la energía, son los puntos donde se expulsan  $H^+$  al exterior: FeS, cit  $bc_1$ , cit  $aa_3$ . En estos tres puntos funciona la ATPasa de membrana que sintetiza ATP (resultado final de la cadena de transporte de electrones).

Por cada molécula de NADH podemos sintetizar 3 moléculas de ATP, si entramos en pasos posteriores al NADH sintetizamos menos ATP, nos saltamos una parte de la cadena. El NADH tiene  $-0.32V$ , si usamos un elemento menos electronegativo nos saltamos regiones de síntesis de ATP. Cuanto más electropositivo en el compuesto menor energía genera.

Ej. *Paracoccus* en fotocopia.

*E. coli* carece del cit b y del cit a y posee el cit d que cede los electrones al oxígeno.

### CONSERVACIÓN DE LA ENERGÍA

Se produce por una fuerza protón-motriz. Los electrones siguen una ruta diferente de los protones. Estos protones van a ser translocados fuera de la membrana, fuera de la bacteria o de la mitocondria. Hay una diferencia de carga, de gradiente



electroquímico formando una fuerza motriz de protones. El gradiente se usa en la síntesis de ATP por la ATP sintetasa (introducción de H<sup>+</sup>).

### TIPOS DE FERMENTACIONES:

La mayoría del carbono va a los productos de deshecho, una menor parte va a la síntesis de biomasa debido a que existe menos ATP que en la respiración.

Para la síntesis de ATP por fosforilación a nivel de sustrato se usan muchos compuestos rico-energéticos. Hay multitud de sustancias que se pueden fermentar: Acetil-CoA, Succinil-CoA, Butiril-CoA, etc. son muy electronegativos y rico-energéticos con elevada energía almacenada en su enlace.

Otros pueden ser por ejemplo el fosfoenol pirúvico.

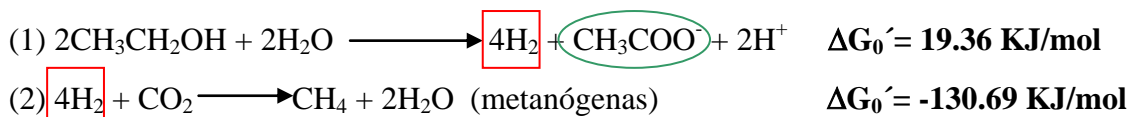
Hay purinas, alcoholes, ácido láctico, fumírico, azúcares, aminoácidos, etc.

En una fase media nos queda los compuestos rico-energéticos, antes de la fosforilación a nivel de sustrato se usan primero la síntesis de compuestos rico-energéticos fosforilados.

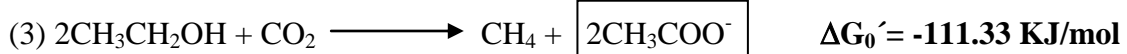
Las fermentaciones se nombran por los productos que fermentan o los finales:

- .- F. Alcohólica. (*Zymomonas*, levaduras).
- .- F. Cítrica. (Levaduras).
- .- F. Homoláctica. (Lactobacterias, *Streptococcus*).
- .- F. Heteroláctica. (*Leuconostoc*, algunos *Lactobacillus*).
- .- F. Propiónica. (*Propionibacterium*, *Clostridium proionicum*).
- .- F. Ácido mixta. (Enterobacterias: *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*).
- .- F. Butírica. (*Clostridium butiricum*).
- .- F. Butanólica. (*Clostridium acetobutylicum*).
- .- F. Homoacetogénica. (*Acetobacterium*)
- .- F. Metanogénica. (*Methanotrix*, *Methanosarcina*)

\* Sintrofias: Comen juntos, el producto final de una fermentación es el sustrato de otros microorganismos, ej. el lactato de la fermentación heteroláctica es usada para hacer la fermentación propiónica. Esto ocurre cuando algunas fermentaciones son termodinámicamente desfavorables. P.ej:



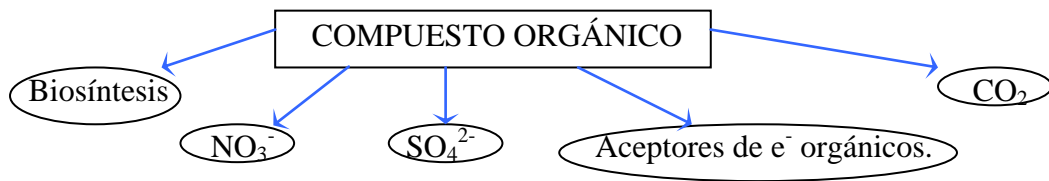
Se usa el H<sub>2</sub> en ambas reacciones con una ΔG<sub>0</sub>' = -130 KJ/mol. Resultado final:



Esto sale de restar la 1 y la 2. La 1 ocurre porque está acoplada con la 2 dando la reacción 3.

### 2.3 RESPIRACIÓN ANAEROBIA.

(pág. 501 Brock)



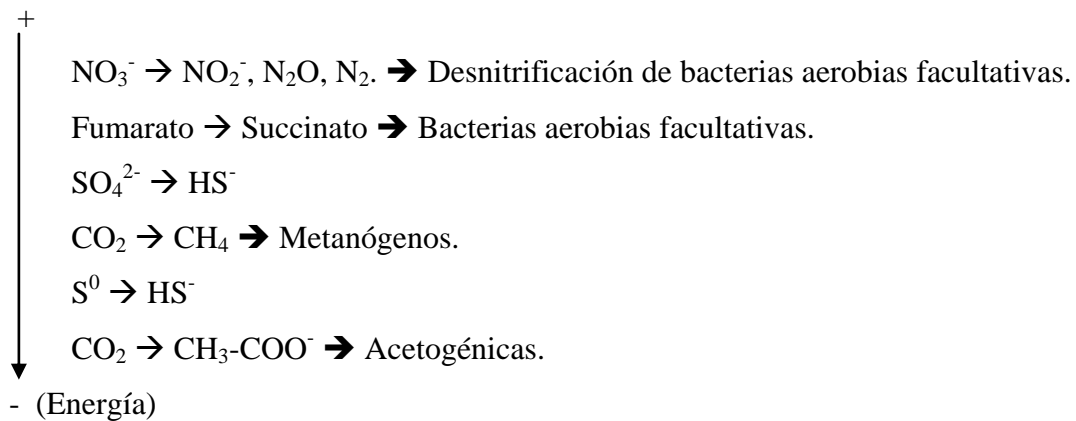
.- Quimiolitótrofos:

- Compuestos inorgánicos → O<sub>2</sub>
  - CO<sub>2</sub> → Biosíntesis
- } Autótrofo

.- Fotolitótrofos:

- Luz → O<sub>2</sub>
  - CO<sub>2</sub> → Biosíntesis
- } Autótrofo.

Hay diferentes aceptores de e<sup>-</sup> distintos del O<sub>2</sub> : Fe<sup>3+</sup> → Fe<sup>2+</sup>. Bacterias aerobias facultativas y bacterias anaerobias obligadas.



#### **2.3.1.- REDUCCIÓN DEL NITRATO: PROCESO DE DESNITRIFICACIÓN.**

(pág. 502 Brock)

Hay dos tipos de rutas bioquímicas diferentes por la que se reduce el nitrato (en forma de sal).

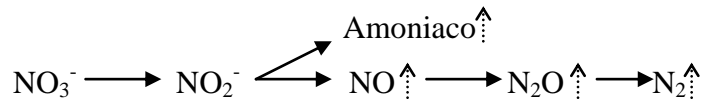
**A.- Ruta asimilativa.** En plantas, hongos y algunas bacterias y algas.



Poseen la enzima **nitrato reductasa asimilativa** (1) que reduce el  $\text{NO}_3^-$ . Es una enzima reprimida por el **amonio** ( $\text{NH}_3$ ). También tienen la **nitrito reductasa** (2) que reduce el  $\text{NO}_2^-$  a hidroxilamina, es también reprimida por el **amonio**.

A esta ruta se la llama asimilativa porque el N pasa a N orgánico se termina asimilando. Aquí se us los compuestos inorgánicos como alimento y una vez nutrido la bacteria deja de reducir el nitrato.

**B.- Ruta desasimilativa.** Se da en bacterias.



Poseen la enzima **nitrato reductasa desasimilativa**, que es diferente a la enzima de la ruta asimilativa. Se van formando compuestos que se eliminan al exterior no se asimilan. Se reduce el  $\text{CO}_3^-$  de forma continua no como antes.

Todas las enzimas están **inhibidas por  $\text{O}_2$** . El gen de la nitrato reductasa desasimilativa también está inhibido por  $\text{O}_2$ . Por ello sólo se da en anaerobiosis estricta.

Este proceso es no deseado en agricultura y es el que se desea en aguas residuales, el N lo pueden usar las algas. Es el proceso que se realiza para usar el  $\text{CO}_3^-$  como aceptor de electrones.

Ambas rutas son totalmente diferentes. Hay un flujo de electrones diferente en ambas rutas.

.- Aerobicamente  $\rightarrow \text{O}_2$  como aceptor final de electrones.

.- Anaerobiosis  $\rightarrow \text{NO}_3^-$  es el aceptor final.

(*E. coli* es anaerobia facultativa)

### 2.3.2.- REDUCCIÓN DEL SULFATO (RESPIRACIÓN ANAEROBIA DEL SULFATO)

- Son bacterias sulfatorreductoras.

-  $\text{SO}_4^{2-}$  es la forma más oxidada del S. Es muy abundante en el agua del mar. La reducen a  $\text{SH}_2$  que es la forma más reducida, puede ser eliminado al exterior (ruta desasimilativa) o asimilado para formar aa, etc.

Compuesto	estado de oxidación
Sulfuro(H <sub>2</sub> S)	-2
S elemental (S <sup>0</sup> )	0
Tiosulfato (S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )	+2
⋮	⋮
Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	+6

Usan donadores de electrones orgánicos pero también usan el H<sub>2</sub>. El láctico, pirúvico e H<sub>2</sub> son los más usados. Ceden electrones a los compuestos del S hasta la forma más reducida que es el H<sub>2</sub>S.

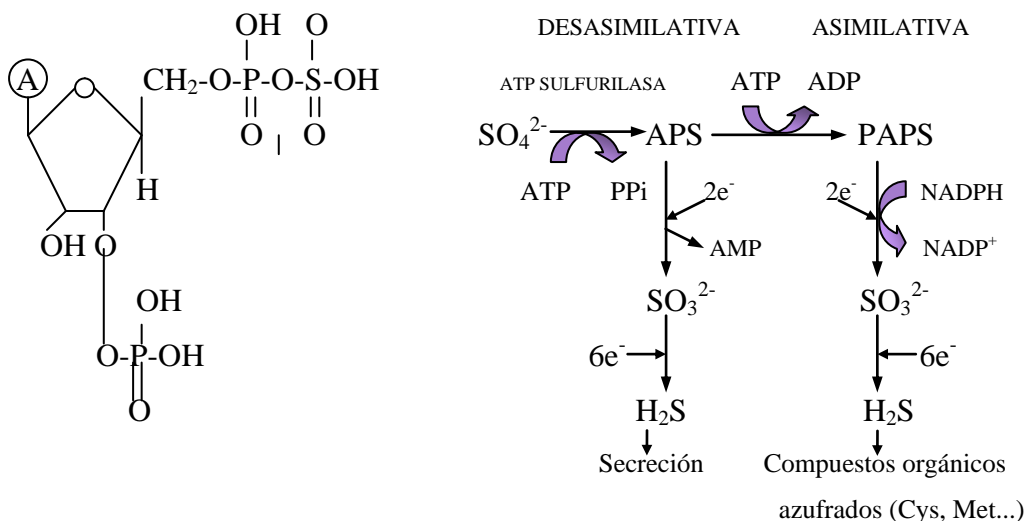
.- E<sub>0</sub>'(SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/SH<sup>-</sup>) = -0.22 → Menos desfavorable como aceptor de electrones que el O<sub>2</sub> o el NO<sub>3</sub>.

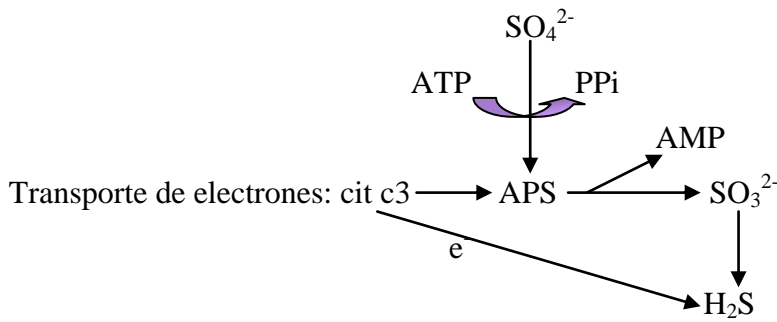
Tenemos dos tipos de rutas: La asimilativa y la desasimilativa.

El SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> es estable, no se reduciría, para que se reduzca a sulfito es necesario que se active en ambas rutas, esto lo consigue por acción de enzimas **ATP-Sulfurilasa** que unen un ATP al SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> quedando APS (adenosín fosfosulfato)

**A.- Ruta asimilativa.** A partir del APS se toma otro fosfato y se forma el PAPS por la enzima **adenosín fosfosulfoquinasa**. Luego se forma sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) eliminando PAP que se reduce en diferentes reacciones a H<sub>2</sub>S que formará parte de compuestos orgánicos sulfurados (Cys y Met).

**B.- Ruta desasimilativa.** A partir del APS se reduce a SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> por liberación de AMP, por pasos sucesivos se origina H<sub>2</sub>S que se echa al medio de cultivo acidificándolo (ácido sulfhídrico) y con un olor característico.



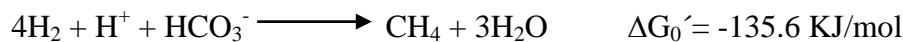


### 2.3.3.- CO<sub>2</sub> COMO ACEPTOR DE e<sup>-</sup>: METANOGÉNESIS Y ACETOGÉNESIS. (RESPIRACIÓN ANAEROBIA DEL CO<sub>2</sub>).

(pág. 508 Brock)

El CO<sub>2</sub> es muy común (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), el CO<sub>2</sub> es el producto final del metabolismo energético de los quimiorganótrofos. Los organismos que realiza la respiración del carbono el CO<sub>2</sub> recoge los electrones que vienen del H<sub>2</sub> o de un compuesto orgánico que suele ser el lactato.

.- Los metanógenos (arqueobacterias). El CO<sub>2</sub> pasa a CH<sub>4</sub>. Muchas usan el H<sub>2</sub> como donador:



.- Los homoacetogénicos (*Clostridium* es un Gram+ esporulado o *Acetobacter* que es GRAM- no esporulado), pasan el CO<sub>2</sub> a acetato (CH<sub>3</sub>COOH).



Estos dos tipos al crecer así, crecen de forma autótrofa (usan el CO<sub>2</sub> como fuente de energía y de carbono) y quimiolitótrofa. Son anaerobios estrictos.

Obtienen más energía los metanogénicos, viven en el estiércol.

Usan una modificación del ciclo de Krebs en el flujo del carbono.

Bioenergía: Fotocopia

### 2.3.4.- RESPIRACIÓN DEL Fe:

El ion férrico (Fe<sup>3+</sup>) acepta e<sup>-</sup> y pasa a ion ferroso. Se obtiene energía en un gradiente de H<sup>+</sup> y se sintetiza ATP.

*Shewanella putrefaciens* lo realiza, también puede usar el Mn<sup>4+</sup> y selenio (Se<sup>4+</sup>) que capta electrones.

El ion ferroso es soluble, podrían usarlo los litótrofos del Fe y se cerraría el ciclo.

**2.3.5.- RESPIRACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS:**

Algunos compuestos orgánicos pueden ser aceptores de electrones. Como el fumarato que capta  $e^-$  y pasa a succinato., esto es una fermentación porque el fumarato no lo pone la célula sino que es exógeno. Esta reacción es la más frecuente.

DMSP  $\rightarrow$  DMS

TMAO (óxido de trimetilamina)  $\rightarrow$  TMA

EL DMSO y el TMAO le dan olor al pescado podrido.

(¿Por qué usan lactato como donador de  $e^-$ ? El lactato no puede fermentarse, sólo puede oxidarse, respirarse, por eso lo usan. El lactato es el producto final de la fermentación láctica).

En la respiración anaeróbica se producen elevadas cantidades del compuesto reducido porque lo que interesa es obtener mucha energía (cuanto más reduzcan mejor).

**2.3.4.- OTROS ACEPTORES DE  $e^-$  EN LA RESPIRACIÓN ANAEROBIA.**

(FOTOCOPIA).

- .- Ion mangánico ( $Mn^{4+}$ ).....+0.78 V
- .- Ion férrico.....+0.77V
- .- Arsenato (contaminante).....+0.139V
- .- Selenato (contaminante).....+0.475V
- .- etc.

## **TEMA 11.- GENERACIÓN DE ENERGÍA (CONTINUACIÓN)**

### **1.- OBTENCIÓN DE LA ENERGÍA EN FOTOAUTÓTROS.**

(pág. 476 Brock)

La fotosíntesis es el proceso por el que la energía luminosa se convierte en energía química. Usan el CO<sub>2</sub> como única fuente de carbono que reducen a compuestos orgánicos, para eso usan la energía luminosa. El poder reductor puede venir del agua o de otros compuestos químicos como SH<sub>2</sub>, S<sup>0</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, H<sub>2</sub>, etc. LA reacción de extracción de e<sup>-</sup> puede estar mediada por la luz, se llama fotólisis y esto sólo se conoce en el caso del agua.

Para que se de la fotosíntesis son necesarios ciertos pigmentos fotosintéticos, principalmente son las clorofilas, que absorben en cuantos, y son anillos tetrapirrólicos con un átomo de Mg<sup>2+</sup> en el centro. En un anillo hay una cadena larga de fitol que permite insertar en membrana una molécula de clorofila. Pueden llevar distintos sustituyentes en los anillo y obtendremos diferentes clorofilas: la Chl a y la Chl b, absorben entre 680-700nm, también absorben a 340, es decir hay dos picos en el espectro de absorción de las clorofilas, el pico de 300 nm está en la zona del rojo mientras que el de 700 nm en el azul. Emiten en la región intermedia, el verde.

Existe bacterioclorofilas que van de la a a la f, absorben de 870 nm a 1020 nm, ocupan regiones del espectro que no ocupan las clorofilas. Una planta y una bacteria no compiten por la misma longitud de onda, ocupan diferente nicho de luz por lo que pueden convivir.

Cuando a una clorofila le falta el Mg<sup>2+</sup> son Feofitinas.

El crecimiento de un fotoautótrofo está caracterizado por dos tipos de reacciones:

.- Fase luminosa: da ATP y coenzimas reducidos con poder reductor (e<sup>-</sup> para la reducción del CO<sub>2</sub>). Con luz.

.- Fase oscura: el ATP y el NADPH formados anteriormente se usan en procesos para reducir y fijar el CO<sub>2</sub>. Sin luz.

El NADPH puede originarse por la forma oxidada por e<sup>-</sup> de diferentes donadores externos.

.- **Bacterias púrpuras y verdes** → Usan sulfhídrico y compuestos orgánicos del medio.

Fotosintetización anoxigénica.

.- **Plantas verdes, algas y cianobacterias** → Oxidan el agua y se obtiene O<sub>2</sub> y e<sup>-</sup>.

Fotosintetización oxigénica.

Las clorofilas están en la membrana, hay distintos tipos de clorofilas en plantas, *Cianobacterias* y algas verdes tienen la clorofila a. Varían por unos radicales, la bacterioclorofila a está en bacterias púrpuras y verdes del S, confiriéndole un espectro de absorción diferente. La clorofila a tiene un máximo de absorción a los 430nm (luz azul) y otro a 680nm (luz roja).

Los microorganismos fotosintetizadores oxigénicos tienen otros pigmentos, carotenoides que captan otras longitudes de onda. Los carotenoides son lípidos con dobles enlaces alternos, de color rojo, anaranjado o amarillo. Absorben en el azul. Protegen del efecto fotodinámico del oxígeno (protección frente a un O<sub>2</sub> muy reactivo).

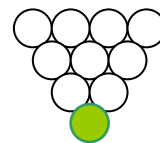
También existe otros pigmentos que son **ficobiliproteínas** son las **Ficocianinas** y las **Ficoeritrinas**, son tetrapirroles en posición lineal (no llevan Mg<sup>2+</sup>). Están asociados con proteínas, existe en *Cianobacterias* y absorben a 550 nm. No ocupan el nicho de nadie.

Las clorofilas absorben el rojo y el azul y eliminan el verde, tanto la clorofila a como la bacterioclorofila.

Están en membranas fotosintéticas, en plantas están en los tilacoides. En bacterias están en la membrana plasmática y en otras ocasiones en clorosomas (en procariontas), en las bacterias rojas y púrpuras están en la membrana plasmática invaginada, mientras que en heliobacterias se encuentra en vesículas citoplasmáticas y en bacterias verdes están en los clorosomas (*Chlorobium*).

En los centros de reacción (complejo antena) hay 200-300 moléculas de clorofila, forman el complejo antena, ceden la energía al centro de reacción (1 molécula de clorofila).

Fotosintetizan incluso a baja intensidad de luz.



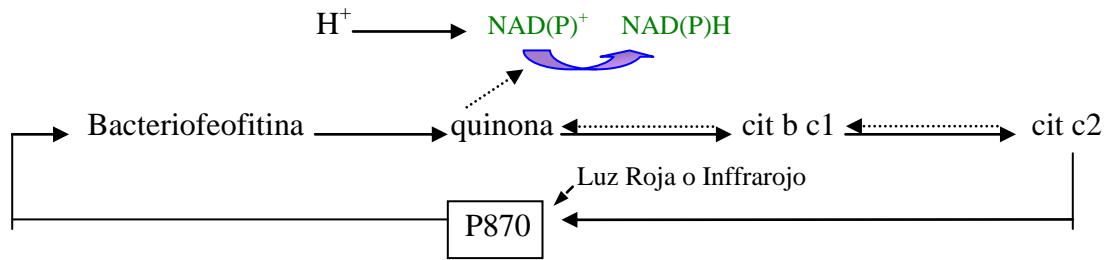
## 1.1 FOTOSÍNTESIS ANOXIGÉNICA.

(pág. 479-483 Brock)

Sólo se produce ATP y no se genera el O<sub>2</sub>. Lo hacen las bacterias. El aparato fotosintético tiene 5 complejos diferentes: la ATPasa, el complejo antena I, el II, el centro de reacción y el citocromo bc<sub>1</sub> (también existe en la respiración).

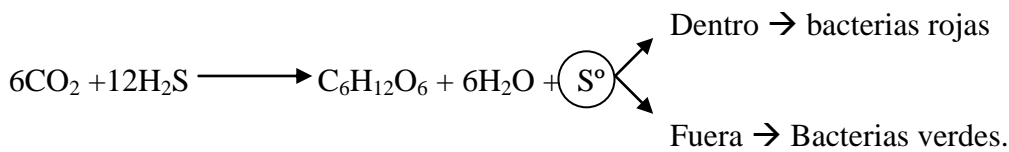
Tenemos una molécula de clorofila que es el fotosistema P870 nm, con un potencial muy positivo, toma parte de la luz roja e infrarroja y pasa a un estado excitado más negativo capaz de ceder electrones. Estos electrones siguen un flujo a través de transportadores.





Este gradiente de  $e^-$  está dentro de la membrana. Se crea un gradiente de  $H^+$  que forma ATP.

El  $H_2S$  (sulfhídrico),  $S_2O_3^{2-}$  (tiosulfato),  $S^0$  y en algunos casos el  $Fe^{2+}$  (ferroso) pueden ceder los  $e^-$  al fotosistema I. Para ceder esos  $e^-$  y crear NADPH hay que gastar  $e^-$ , desde el cit c2 a la quinona.



.- género *Chlorobium* → echa hacia fuera el  $S^0$ .

.- género *Chromatic* → bacterias rojas del S, quedan el  $S^0$  dentro.

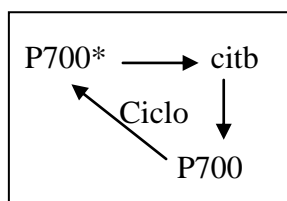
Crece más lentamente ya que usan parte del ATP en obtener NADPH.

## 1.2 FOTOSÍNTESIS OXIGÉNICA.

Hay dos fotosistemas (I y II) el FS I es semejante al anoxigénico. El FS II es el P680 se excita por luz y pasa a  $P680^*$ . El agua es menos electropositiva y facilita el paso de  $e^-$ . Hay fotólisis del agua, esta fotólisis se da porque el P680 es un sistema altamente reductor. Es una rotura del  $H_2O$  determinada por la luz. Los  $e^-$  van pasando por una cadena de transporte de electrones.



El P700 es muy electronegativo, cede los  $e^-$  con mucha facilidad, pasa a  $P700^*$  y cede los  $e^-$  a una Fd y al NADP originando NADPH. Los  $H^+$  que van atravesando la membrana crean un gradiente de  $H^+$  que sintetiza ATP. También puede ceder los  $e^-$  al cit b en un flujo cíclico de  $e^-$  para crear ATP.



Este ciclo ocurre bajo ciertas condiciones (ausencia de  $O_2$  y presencia de  $H_2S$  o  $H_2$ ) dando una fotosíntesis anoxigénica (ej. *Oscillatoria limnética*, deja depósitos de  $S^0$ ). Esto ocurre cuando existe mucho poder reductor en la célula y lo que hace falta es energía.

Se cree que la fotosíntesis cíclica es más antigua que la oxigénica ya que existe un microorganismo con dos fotosistemas conserva vestigios de fotosíntesis cíclica.

**CICLO DE CALVIN:** El ATP y el NADPH se usan en la fijación del CO<sub>2</sub>. La enzima principal implicada es la RUBISCO que añade el CO<sub>2</sub>.

La ribulosa-1,5-bifosfato se condensa con 6 moléculas de CO<sub>2</sub> y da un complejo inestable que se rompe dando 12 moléculas de 3PGlicerato.

Éstas 12 moléculas se reordenan y dan una fructosa y 10 3PGLH (que se reordenan dando 6-ribulosa-5P).

Las enzimas implicadas son: La Ribulosa-1,5- bi-P Carboxilasa (RUBISCO): introduce el CO<sub>2</sub>. Está en los carboxisomas. Y la **Ribulosa-5-P fosforilasa** o **Fosforibuloquinasa**. Ambas enzimas controlan el ciclo.

El ciclo de Calvin lo usan bacterias, *Cianobacterias*, vegetales, etc. Existe variaciones en la fijación del CO<sub>2</sub>.

## 2.- QUIMIOLITOTROFÍA.

(pág. 490 Brock)

Oxidación de compuestos inorgánicos como fuente de energía y el CO<sub>2</sub> para la biomasa. Para crecer sobre CO<sub>2</sub> se necesita ATP y poder reductor

.- La obtención de ATP es semejante al quimiorganótrofo pero acoplada a la oxidación de un compuesto inorgánico y no orgánico.

.- El NADH se puede obtener:

1) directamente del compuesto inorgánico (si el E<sub>0</sub> es suficientemente negativo).

2) Con reacciones reversas de transporte de e<sup>-</sup>. Necesitan consumir ATP.

### RENDIMIENTO ENERGÉTICO:

REACCIÓN	QUIMIOLITÓTROFOS
◆ $H_2 + 1/2O_2 \rightarrow H_2O$	bacterias del hidrógeno.
◆ $HS^- + H^+ + 1/2O_2 \rightarrow S^0 + H_2O$	bacterias del azufre.
◆ $S^0 + 1/2O_2 + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$	bacterias del azufre.
◆ $NH_4^+ + 1/2O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O$	bacterias nitrificantes.
◆ $NO_2^- + 1/2O_2 \rightarrow NO_3^-$	bacterias nitrificantes.
◆ $Fe^{2+} + H^+ + 1/4O_2 \rightarrow Fe^{3+} + 1/2H_2O$	bacterias del hierro (crecimiento lento).

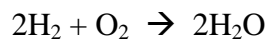
Estos compuestos son muy frecuentes en la naturaleza, bien por acción natural ( $S^0$  en vacas) o por acción del hombre en minería, etc.

Estos compuestos ceden los electrones al oxígeno en general, pero pueden existir otros aceptores de electrones como el  $NO_3^-$  siempre que se cumplan las condiciones de diferencia de potencial.

## 1.- BACTERIAS DEL HIDRÓGENO.

El  $H_2$  es un producto del metabolismo microbiano. Es un grupo taxonómico variado, se subdivide en:

**1.A Bacterias aerobias oxidantes del hidrógeno:** bacterias del hidrógeno, el aceptor final es el  $O_2$ . Son típicas quimiolitótrofas. Usan como flujo de carbono el ciclo de Calvin



**1.B Bacterias anaerobias:** el aceptor final es otro compuesto diferente al oxígeno. (Vistas anteriormente).

En general:

- .- Las bacterias del hidrógeno son: *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Alcaligenes*, etc.
- .- Muchas son quimiolitótrofos facultativos. Pueden crecer también como quimiorganótrofos usando compuestos orgánicos.

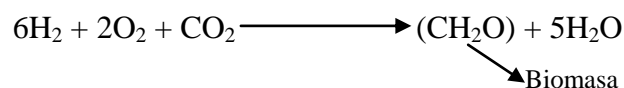
- .- Todas las bacterias poseen un enzima clave ligada a membrana que es la *Hydrogenasa*, escinde el  $H_2$  y cede a la cadena de transporte de  $e^-$  los electrones. Se crea el gradiente de  $H^+$  para formar ATP. Están asociados a la membrana plasmática y componentes de la cadena de transporte de electrones.

Algunos microorganismos poseen hidrogenasa soluble que cede directamente los electrones a los coenzimas y obtiene poder reductor, Ej. *Alcaligenes eutrophus*. Pueden producir NADH o NADPH por otras enzimas que son las *transhidrogenasas*:



No necesitan el flujo reverso de  $e^-$ . Dan mejores rendimientos celulares y con crecimiento rápido. No gastan ATP para crear el NADH.

- .- Cuando crecen autotróficamente usan el ciclo de Calvin:



.- Existen bacterias que pueden crecer *mixotroficamente*: usan el H<sub>2</sub> como fuente de e<sup>-</sup> y usan un compuesto orgánico como fuente de carbono.

## 2.- BACTERIAS DEL AZUFRE.

(pág. 492 Brock)

Se las llama bacterias incoloras del azufre para distinguirlas de las bacterias fotosintetizadoras del azufre (anoxigénicas), que son las bacterias púrpuras y verdes.

Usan compuestos reducidos del azufre como donadores de e<sup>-</sup>: S<sup>0</sup>, H<sub>2</sub>S, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Al disminuir ΔG<sup>o</sup> el rendimiento es menor, (fotocopia)

Se produce un descenso en el pH ya que se forma H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se acidifica el medio de cultivo, se eliminan H<sup>+</sup> al medio por la oxidación de las moléculas anteriores.

Existen etapas intermedias en una misma bacteria del H<sub>2</sub>S (oxidación por etapas):

$$\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$$

En algunas bacterias oxidadoras del S aparecen S<sup>0</sup> elemental en el citoplasma (ej. *Beggiatoa* o *Thiothrix*). Acumulan S<sup>0</sup>, este azufre, una vez desaparece la fuente externa, puede servir como nuevas fuentes y oxidarse más, son reserva de energía.

Winogradsky estudió a *Beggiatoa*. Fue pionero en estudios de quimiolitotrofia, demostró que se podía fijar CO<sub>2</sub> independientemente de la presencia de pigmentos. Usan el ciclo de Calvin para fijar CO<sub>2</sub> independientemente de las clorofilas, (oxidación de un compuesto orgánico).

RENDIMIENTO ENERGÉTICO: Hay un transporte inverso de electrones por la cadena de transporte de e<sup>-</sup> hacia os coenzimas oxidados. (Fotocopia).

Crecimiento relativamente escaso de los quimiolitótrofos del azufre.

Los 8 e<sup>-</sup> que se transportan dan bastante energía, si se va desde SH<sub>2</sub> o S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> se obtiene menos energía.

\* CONSIDERACIONES BIOSINTÉTICAS:

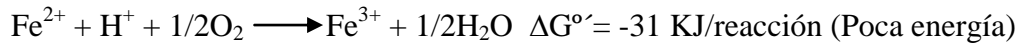
.- Usan el ciclo de Calvin en crecimiento autótrofo.

.- Otros usan un crecimiento anaerobio por el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor de e<sup>-</sup> (en respiración anaerobia).

.- Existen bacterias que crecen mixotroficamente usando H<sub>2</sub>S como donador de e<sup>-</sup> y usando un compuesto orgánico como fuente de C (*Beggiatoa*).

### 3.- BACTERIAS OXIDADORAS DEL HIERRO.

(pág. 495 y 575 Brock)



El  $\text{Fe}^{2+}$  en disolución a pH neutro es inestable, se oxida a  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  que precipita, esto ocurre en presencia de  $\text{O}_2$ . Sólo es estable a ese pH cuando no existe  $\text{O}_2$  en el medio.

Este metabolismo con  $\text{O}_2$  realizado por las bacterias necesita un pH bajo (aprox. 2) donde el  $\text{Fe}^{2+}$  es estable frente a la oxidación química.

Son bacterias *acidófilas estrictas*.

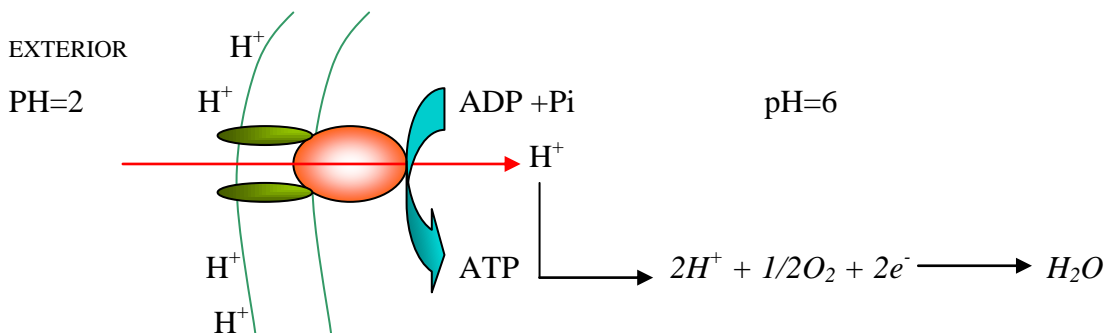
Muchas bacterias también tienen la capacidad de oxidar el S. Ej. *Thiobacillus ferroxidans*, *Sulfolobus acidocaldarius* (termófilo), tiene temperaturas óptimas cerca de la ebullición.

#### ENERGÍA A PARTIR DEL HIERRO FERROSO (*T. ferroxidans*)

El potencial de reducción del par  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  es muy electropositivo. Hay un transporte corto de electrones por la cadena hasta el  $\text{O}_2$ . (fotocopia) (Fig. pág. 494)

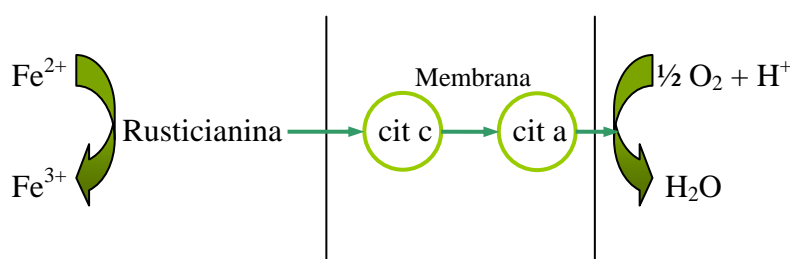
.- La rusticianina es la enzima estable a pH bajo con un óptimo en un pH de 2.

Se cree que la síntesis de ATP ocurre por un mecanismo asociado al transporte de electrones. Se aprovecha el gradiente electroquímico natural existente a ambos lados de la membrana.



Los protones que entran son los que usa el cit a1 para reducir el  $\text{O}_2$  a agua.

El hierro ferroso pasa a férrico por acción de la rusticianina que existe en el espacio periplásmico, cede los  $e^-$  al cit c y éste al  $\text{O}_2$  formándose agua.



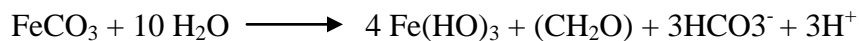
La síntesis de NADH se hace por un flujo reverso por otros sistemas. Usa la energía potencial de la membrana plasmática (el gradiente electroquímico). El ATP se usa en ese transporte reverso de electrones. Es necesario este transporte reverso porque el Fe es más electropositivo que el par  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  que es más electronegativo.

- Existen pocas bacterias oxidadoras del Fe. Se ponen de manifiesto su presencia por precipitado de  $\text{Fe}^{3+}$ . El agua se torna marrón o naranja.

**- Oxidación del hierro a pH neutro:** Otras bacterias oxidan el hierro a pH neutro de forma anóxica. Son fototrofos anoxigénicos.

El  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  a este pH es menos electronegativo y se ceden  $e^-$  al cit C2 del fotosistema de la cadena de transporte de electrones de las bacterias rojas, cierran el ciclo cíclico y forman ATP.

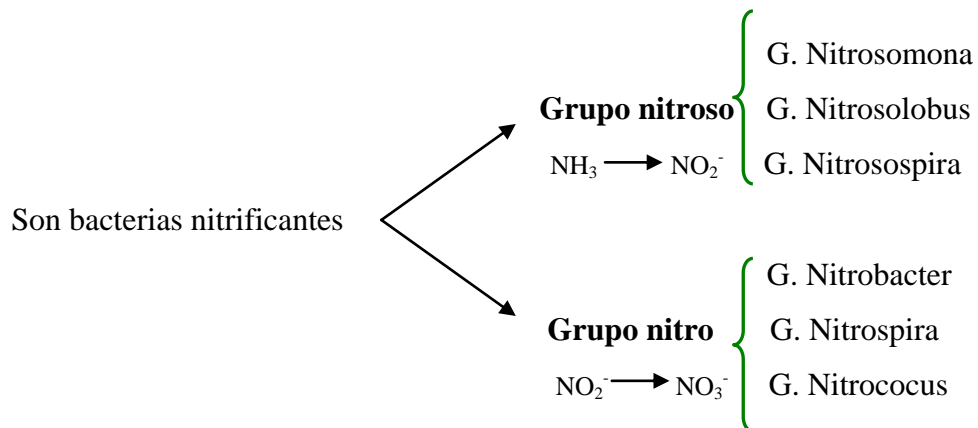
Pueden crecer con  $\text{FeCO}_3$ :



- Este sistema es el primitivo fotosistema

- Estas bacterias explican los grandes sedimentos de hierro en los sedimentos antiguos. (Al principio se pensó que era debido a fotosíntesis oxigénica).

### 3.- BACTERIAS OXIDADORAS DE AMONIACO Y NITRITOS.



- Reacciones energéticas: cadena de transporte de  $e^- \rightarrow$  fuerza  $\text{H}^+$ -motriz  $\rightarrow$  ATP

$$E^0(\text{NH}_2\text{OH}/\text{NH}_3) = 0 \text{ V (primer paso)}$$

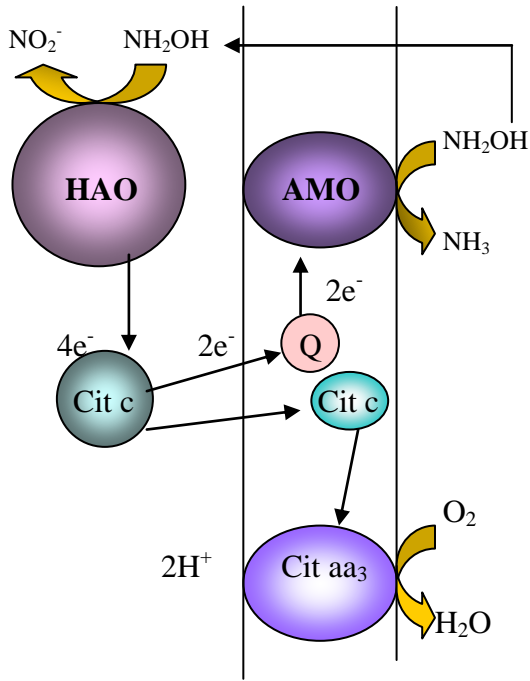
$$E^0(\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-) = +0.43 \text{ V}$$

Con potenciales altos los electrones se deben a la cadena. En los últimos pasos existe menor rendimiento en ATP por  $e^-$ .

.- Grupo nitroso:

Enzimas:

- 1) Amoníaco monooxigenasa (AMO).
- 2) Hidroxilamina oxido reductasa (HOR o HAO)



OXIDACIÓN ANÓXICA DEL  $\text{NH}_3$ : En el caso de aguas de deshecho no oxigenadas o en fangos suplementados con nitrato para estimular la desnitrificación ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2 \uparrow$ ).



$\Delta G_0' = -1483 \text{ KJ/reacción}$ . Es muy exotérmica.

- Esta reacción es muy exotérmica y se libera mucha energía que se cree que está ligada a la conservación de energía del microorganismo.
- Es una reacción dependiente de  $\text{NO}_3^-$ .
- Los microorganismos que la producen son desconocidos.

#### METABOLISMOS DEL CARBONO EN BACTERIAS NITRIFICANTES

(Pág. 499 Brock)

- Usan el ciclo de Calvin para la fijación de  $\text{CO}_2$ .
- Gastan 18 ATP por molécula de glucosa producida.

Esto supone una carga adicional para el ya poco eficiente sistema de generación de energía que poseen, por ello muchos son también quimioorganotrofos (los oxidantes del nitrato).

**TEMA 12.- REGULACIÓN DEL METABOLISMO MICROBIANO****REGULACIÓN DEL METABOLISMO MICROBIANO**

Durante un ciclo celular no todas las reacciones bioquímicas ocurren en la misma extensión ya que unos compuestos se sintetizan más que otros.

Durante condiciones específicas un microorganismo puede necesitar un tipo particular de reacciones y otras no le sirven para nada y no ocurren, de aquí surge la necesidad de *regular el metabolismo*, en respuesta a condiciones diferentes de crecimiento o como parte de un proceso de la vida de la célula.

La regulación permite una mayor eficiencia de los procesos, permite un máximo rendimiento. También existe adaptación. (Ej. la Nitrato reductasa es una enzima que se inhibe por NH<sub>3</sub> en la ruta asimilativa y por O<sub>2</sub> en la desasimilativa).

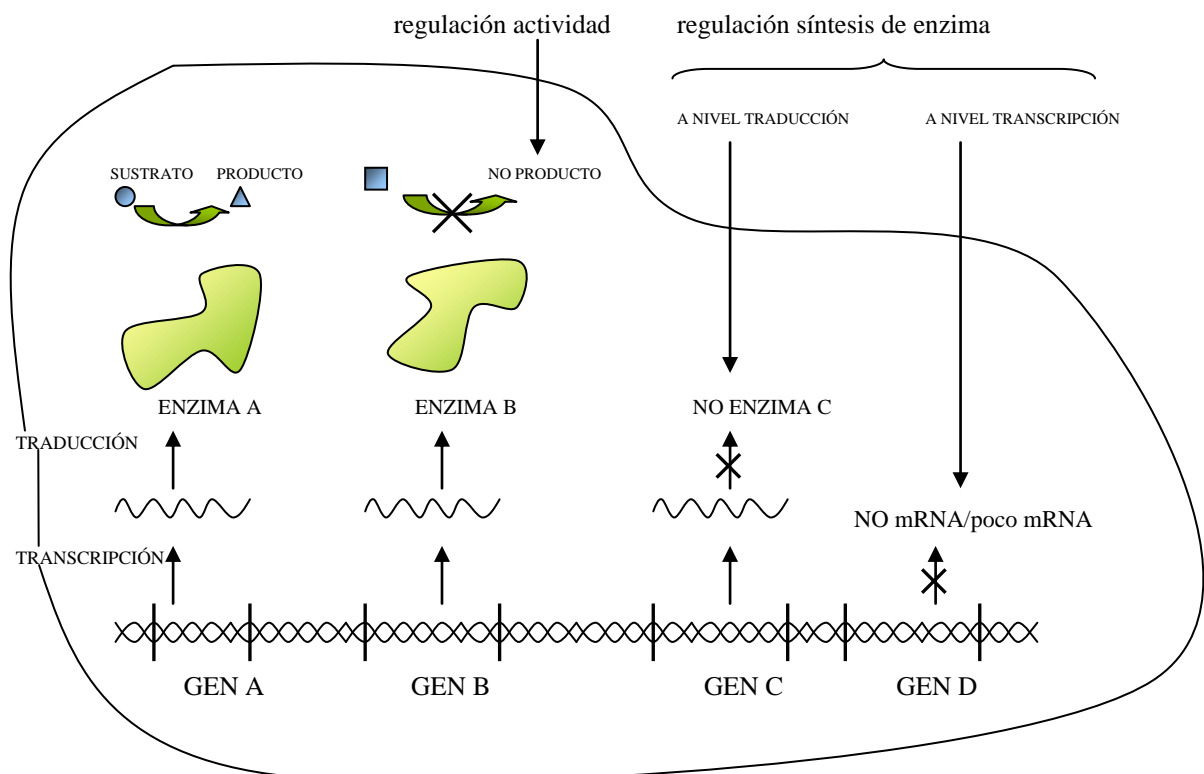
Existen diferentes niveles de regulación:

1.- Regulando la actividad enzimática: nivel postraduccional.

2.- Regulando la cantidad de enzimas:

2.a. nivel transcripcional

2.b. nivel traduccional



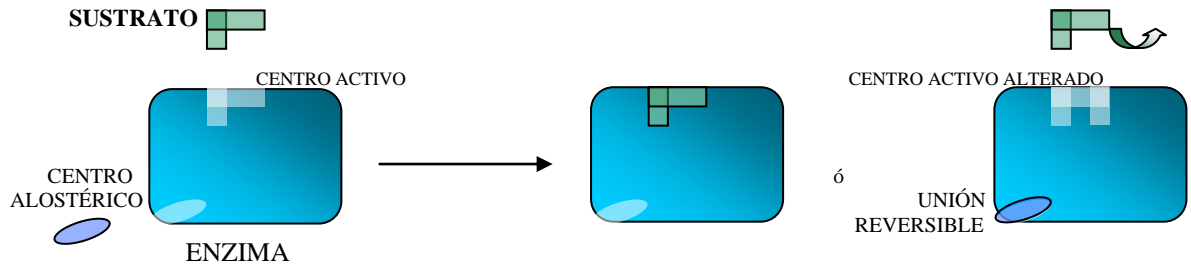


## 1.- REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

(pág. 228 Brock)

La regulación puede ser inhibitoria o activadora. Se da mediante efectores que se unen a la enzima y actúan o inhiben a la misma.

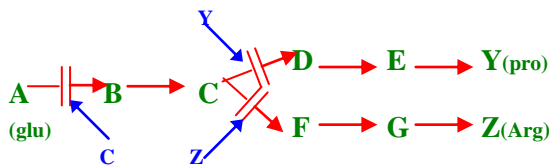
Las enzimas son alostéricas y por ello poseen un mecanismo alostérico:



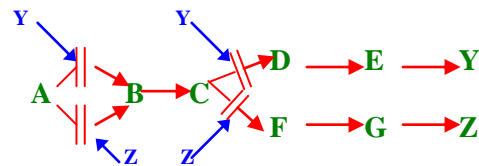
Puede regularse mediante:

**1.- Inhibición por producto:**  $A \rightleftharpoons B$  cuando aumenta la concentración de B se para la reacción.

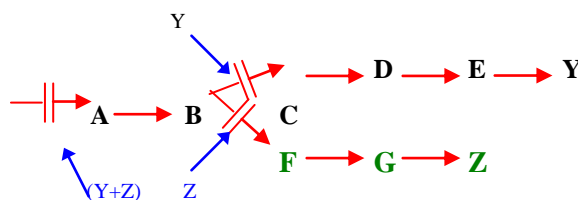
**2.- Retroinhibición:** existen distintos tipos:



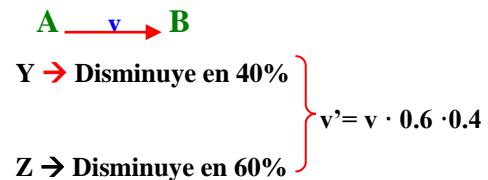
RETROINHIBICIÓN SECUENCIAL



INHIBICIÓN DIFERENCIAL DE ISOENZIMAS



RETROINHIBICIÓN CONCERTADA



INHIBICIÓN ACUMULATIVA

$$v' = v \cdot 0.6 \cdot 0.4$$

**3.- La inhibición covalente:** Es la adición covalente de moléculas sencillas que afectan la actividad como es la fosforilación (añadir fosfatos. Controla la división celular con la actividad quinasa) y la acetilación (añadir grupos cetilo).

Todos los procesos de regulación de este nivel se dan en segundos, si el estímulo es permanente se necesita una regulación a largo plazo.

## 2.- REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ENZIMAS

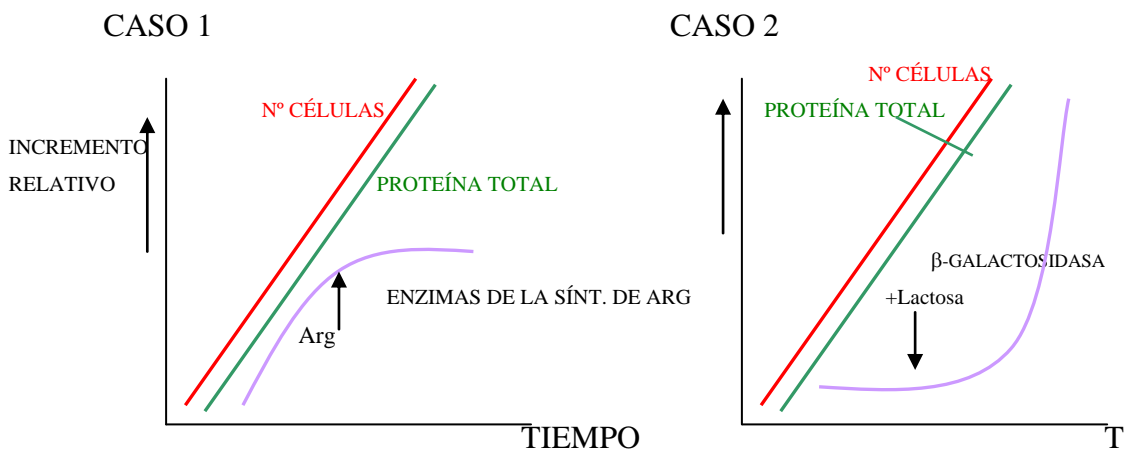
Es más lento, ocurre en minutos. Se puede dar anivel transcripcional o traduccional.

Para que la transcripción ocurra es necesario que la RNA-polimerasa se una al promotor y se sintetice mRNA. La actividad de la RNA-polimerasa puede modularse por unión a otras moléculas.

En general los genes bacterianos se disponen en operones controlados por un mismo operador donde pueden unirse distintas proteínas como es el represor (no se sintetiza mRNA, ya que la RNA-polimerasa no puede avanzar).

### INDUCCIÓN Y REPRESIÓN:

En general el control se produce mediante inducción o represión de los operones. Esto está influido por el ambiente (moléculas pequeñas intervienen en la síntesis de enzimas).

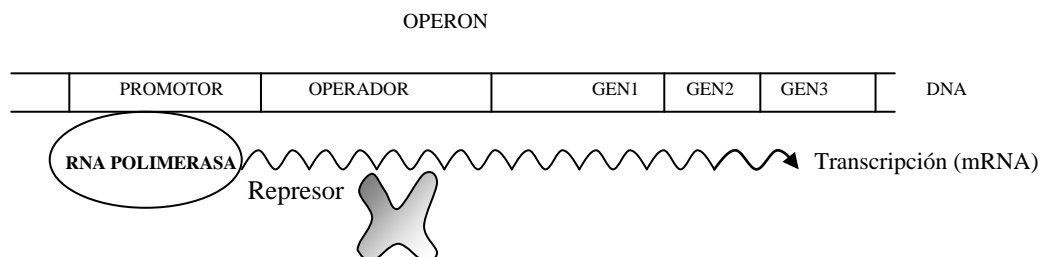


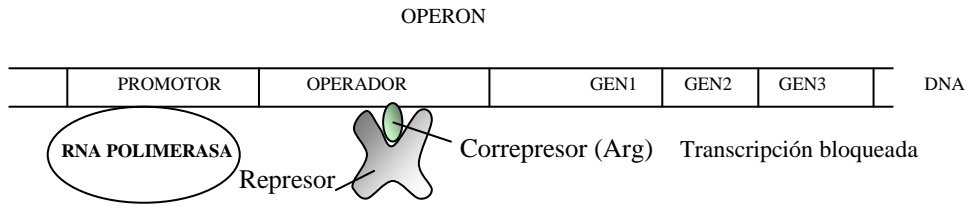
En el caso 1 la arginina es el correpresor mientras que en el 2 la lactosa es un inductor. Ambas son moléculas pequeñas y son efectores.

### **.- Bases bioquímicas de la inducción y la represión:**

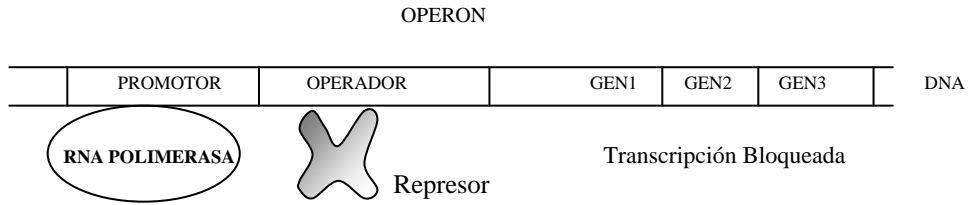
Se da a nivel de la transcripción iniciando o terminando la síntesis de mRNA debido a la unión de *efectores* a *proteínas reguladoras* (represor: proteínas alostéricas de unión al DNA).

#### ♦ Represión enzimática:(Operón de la Arginina)

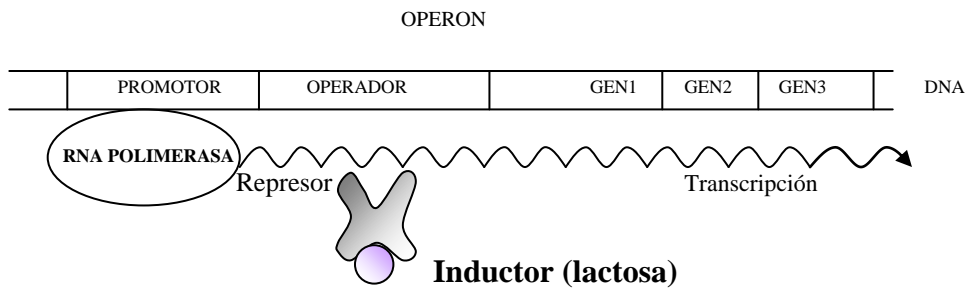




♦ Inducción enzimática (operon de la lactosa)

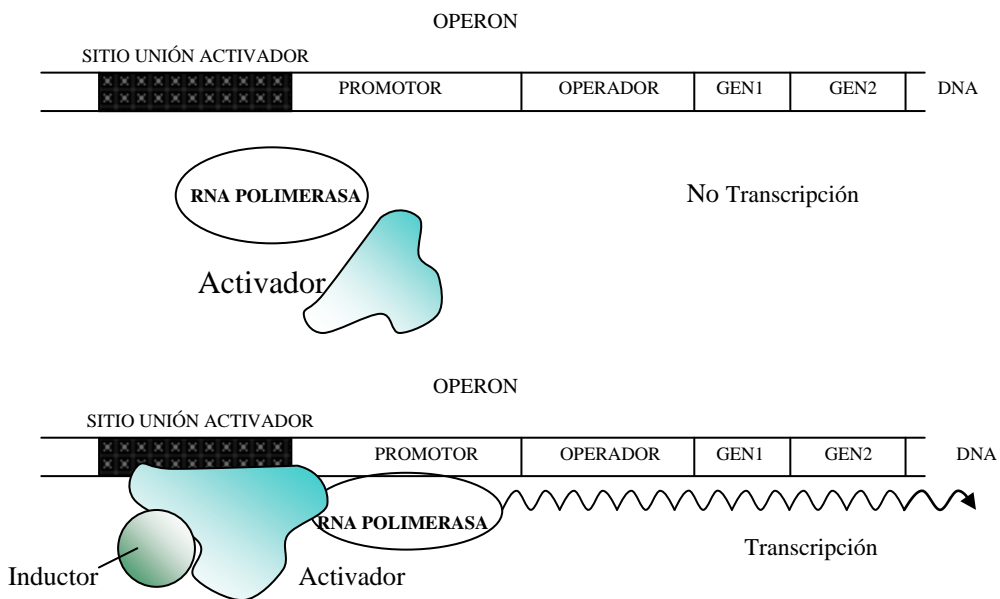


:



En ambos casos existe un control negativo donde el represor tiene una papel inhibitorio como elemento de control.

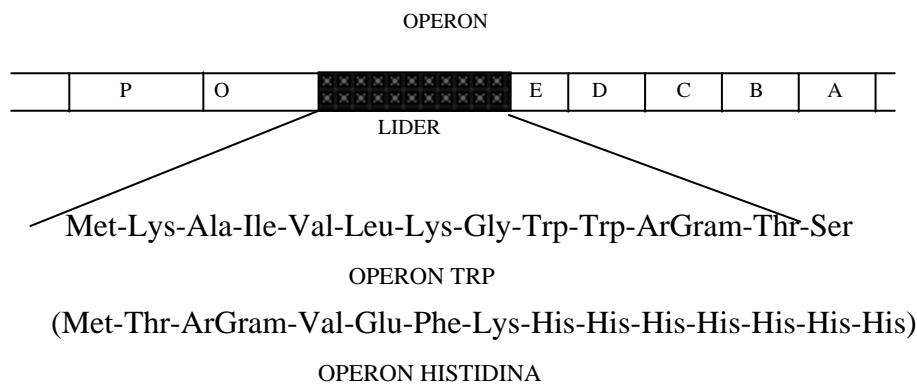
CONTROL POSITIVO DE LA TRANSCRIPCIÓN: Una proteína reguladora promueve la unión de la RNA polimerasa, aumentando así la síntesis de mRNA.



Ejemplos de esta regulación la encontramos en el regulón arginina o en el regulón maltosa ambos pertenecen a un conjunto de operones donde para cada uno de ellos hay sitio de unión de un mismo activador que previamente ha unido Arg o maltosa (*E. coli*).

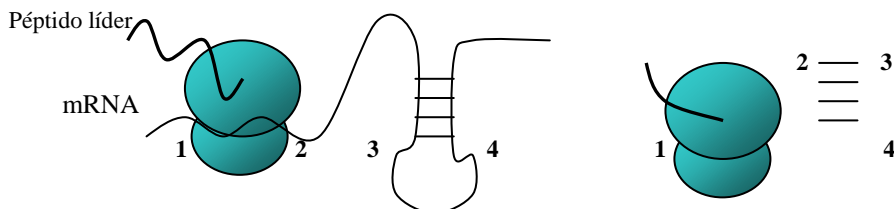
**ATENUACIÓN Y OPERÓN TRIPTÓFANO:**

- ◆ El control de la transcripción se realiza después de la iniciación de la síntesis de RNA, pero antes de que se acabe. El nº de transcritos completos es reducido.
- ◆ Es exclusivo de procariotas y los primeros se derivan de operones para la síntesis de aminoácidos en bacterias Gram – como por ejemplo el operón triptófano de *E. coli* (Thr, Phe, His) en donde existe represión + atenuación.



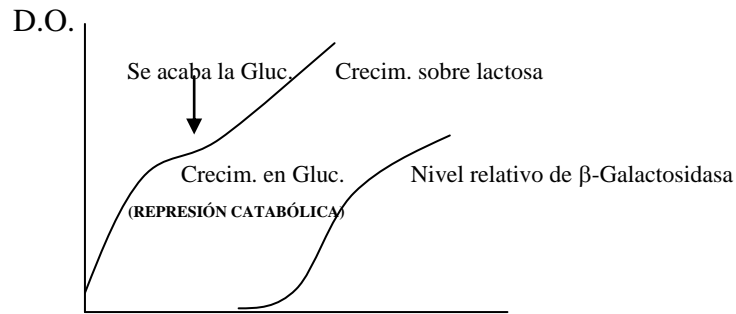
Si abunda el Trp (o His en el operón de la Histidina) se da la síntesis del péptido líder y se bloquea la transcripción de los genes estructurales (no es necesaria más cantidad de dichos aminoácidos).

Al transcribirse el RNA éste tiene 4 zonas con posibilidad de hibridar entre sí. Si existe exceso de Trp se unen la 3 y la 4 y se detiene la transcripción, si lo que existe es carencia el bucle se forma entre el 2 y el 3 y también se detiene la transcripción.



**REPRESIÓN CATABÓLICA:**

Efecto de la glucosa en el crecimiento dinámico. Ej *E. coli* en medio con glucosa y lactosa:

**OPERÓN DE LA LACTOSA:**

Mientras exista glucosa la represión por catabolitos previene la expresión de genes que nada tienen que ver con el metabolismo de la glucosa. Para que se dé la transcripción del operón han de concurrir dos circunstancias:

- 1.- Deben existir niveles altos de AMPc
- 2.- Ha de estar presente un inductor (lactosa) para que el represor no bloquee la transcripción unido al operador.

**TEMA 13.- EL CRECIMIENTO MICROBIANO**

(pág. 151 Brock)

**CRECIMIENTO MICROBIANO****.- Definición**

Es el aumento ordenado de todos los elementos químicos y estructurales de la célula. Se mantiene una composición química constante

En el equilibrio balanceado el incremento de masa es igual al incremento del crecimiento ( $\Delta m = \Delta cto.$ ). La duplicación de la masa está acompañada de cualquier crecimiento de los componentes (proteínas, DNA, RNA).

Existe otro crecimiento desbalanceado en el que no aumenta el DNA aunque si lo hace la masa (ocurre en medio pobre).

La velocidad de crecimiento de todas las células es la misma, la medida de una célula basta para determinar la velocidad de crecimiento.

**DINÁMICA DEL CRECIMIENTO****- Crecimiento poblacional**

Es una reacción autocatalítica de primer orden, la velocidad de incremento de una célula es igual a:  $V = \mu \cdot n^\circ$  células (o masa).

Cuanto más número de células hay más rápidamente aumenta esa población, al velocidad es proporcional al  $n^\circ$  de células.

$$\left. \begin{array}{l} N = n^\circ \text{ de células.} \\ \mu = \text{constante velocidad de crecimiento} \end{array} \right\} \quad dN/dt = \mu \cdot N$$

En un crecimiento balanceado:  $dx/dt = \mu \cdot x$      $dZ/dt = \mu \cdot Z$     Donde x es el peso seco y Z la cantidad de componentes celulares.

$$\text{Ln}Z - \text{Ln}Z_0 = \mu (t-t_0) \quad \mu \text{ define la velocidad de crecimiento.}$$

$$\text{Ln}Z = \text{Log}Z \cdot \text{Ln}10 = \text{Log}Z \cdot 2.30$$

$$\boxed{\text{Ln}Z - \text{Ln}Z_0 = \mu/2.3 (t-t_0)} \quad \text{Si en 4 horas determinamos que pasamos de tener } 10^4 \text{ a } 10^8 \text{ (} t-t_0 = 4-0 = 4 \text{), nos queda:}$$

$$10^8 - 10^4 = 4 \cdot \mu/2.3 \quad \mu = (2.3 \cdot 4)/4 = 2.3 \text{ h}^{-1}. \text{ Con otras condiciones } \mu \text{ será diferente}$$

Un cultivo que pasa en 4h de  $10^4$  a  $10^8$  tiene una velocidad de crecimiento de  $\mu=2.3 \text{ h}^{-1}$ .

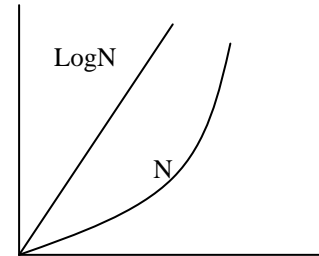
g es el tiempo de generación. Es el tiempo que se requiere para duplicar la población y que pase de Z a 2Z.

$$\ln 2Z - \ln Z = \mu \cdot g \quad g = \ln Z / \mu = 0.693 / 2.303 = 0.42 \text{ h} = 25 \text{ min.}$$

En el ejemplo la población se divide en 25 minutos. A mayor velocidad menor tiempo de generación. Es una ecuación de primer orden, existe una velocidad exponencial entre t y población.

$$Z/Z_0 = 10^{\mu(t-t_0)/2.3} \quad Z = Z_0 10^{\mu(t-t_0)/2.3}$$

Hay una relación exponencial entre población y Tiempo, con logaritmos es directamente proporcional. El logN es una recta mientras que N en función del tiempo es exponencial.



### DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO (MÉTODOS DE MEDIDA)

#### **Nº DE CÉLULAS:**

- ◆ Se realiza en una **cámara hemicitométrica o cámara de recuento** (cámara Thomas).

Consiste en un porta con una excavación con cuadros de área conocida, y una fina capa de líquido.

Es un conteo directo y es rápido pero tiene diversos problemas:

- .- No se distinguen células vivas de las muertas.
- .- Las células pequeñas son difíciles de ver.
- .- Requiere números altos para tener valores precisos ( $10^6$ - $10^7$  como mínimo).
- .- Requiere microscopios de contraste de fases ya que en los normales el contraste es muy malo. También requiere experiencia.

- ◆ **Contador de Coulter.** Tiene una resistencia electrónica que determina un poro por donde pasa el cultivo de células, tiene diferentes resistencias al medio. Clasifica según tamaño, pero ha de estar muy limpio ya que puede contar las partículas como si fueran células. Se basa en la distinta conductividad de las bacterias y el medio líquido (mayor conductividad). Cuando pasa una bacteria disminuye la conductividad

- ◆ **Recuento en placa.** Sólo cuenta las células vivas. Se siembra en placa, se pone una gota del cultivo (líquido) y se reparte por toda la placa. Se forman colonias. De esta forma sólo contamos las vivas. Sin embargo es difícil encontrar un medio satisfactorio donde crezcan los microorganismos. Para evitar la confusión entre colonias de 1 y 2 células juntas se ponen pocas colonias por placa.

Se llama recuento viable ya que sólo mide las células que son capaces de crecer en el medio empleado. Es el más eficaz para contar el número de bacterias.

El error estándar es  $\sqrt{n}$  siendo n el nº de colonias. Cuanto más contemos menor error habrá.

El nº de colonias varía con el tiempo. Es lento, esperamos al día siguiente para contar (24h. a 48h.).

Es muy usado en alimentos, microbiología médica y microbiología acuática, en ésta se sustituyen estos métodos por los filtros. Un volumen se pasa por un filtro, haciendo el vacío para quitar el agua y se pone en agar para que crezcan.

Otro método es teñir al pasar por el filtro.

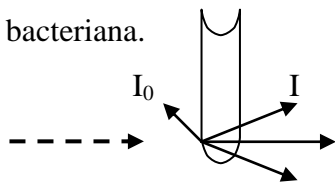
### MASA:

Se puede centrifugar las células y pesar (peso húmedo) pero es mejor el peso seco, para ello se pasa un volumen por un filtro y se coloca en una estufa a 80°C realizando esta operación varias veces. El peso seco es 1/3 del peso húmedo.

Se puede determinar el N total y con ello las proteínas totales.

La actividad metabólica provoca un consumo de oxígeno y se produce CO<sub>2</sub> y láctico, con lo que podemos medir dicha actividad.

Lo normal son los métodos espectrofotométricos. El haz luminoso pasa a través del cultivo, la reducción en la cantidad de luz por difracción indica la masa bacteriana.



Absorvancia =  $\log I_0/I = \text{Luz incidente/Luz transmitida}$ .

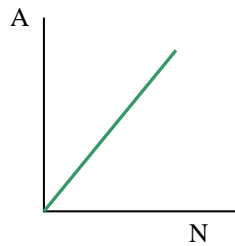
$I = I_0 \cdot 10^{-kl}$  A = -kl (l es la anchura de la cubeta y k el coeficiente de extinción)

Podemos usar un fotómetro cuyas unidades son os Klett y mide la luz bruta (usa un filtro que deja pasar un amplio espectro de luz). O se puede usar un espectrofotómetro que mide la absorvancia como densidad óptica y selecciona la longitud de onda (usa un prisma).

La unidad Klett = O.D./0.002

La absorvancia (A) es proporcional al nº de células o a la masa, selecciona la longitud de onda ( $\lambda$ ). Mientras que el fotómetro no distingue la  $\lambda$  el espectrofotómetro si lo hace.





A partir de la D.O. podemos determinar el nº de células.

(Apéndice 1 Brock)

### CURVA DE CRECIMIENTO

Una bacteria con un tiempo  $g = 20'$  en 48h. da lugar a  $2 \cdot 10^{144}$  bacterias ( $= 2.2 \cdot 10^{43}$ ).

Suponiendo un peso de  $10^{-12}$  g/bact. tendríamos  $2.2 \cdot 10^{31}$  g (4000 veces el peso de la tierra).

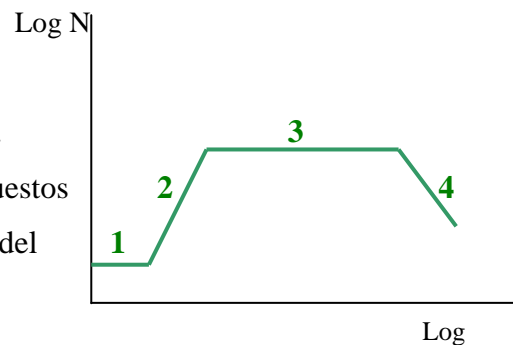
El crecimiento está limitado por nutrientes y por la acumulación de productos de deshecho, la velocidad de crecimiento disminuye y el crecimiento llega a detenerse.

El paso de la fase exponencial a la estacionaria

da un periodo de crecimiento desequilibrado

los componentes se sintetizan a velocidad distinta.

La célula en fase estacionaria posee compuestos Químicos diferentes, depende del factor limitante del crecimiento



Cel. Estacionaria < cel. Exponencial. Las estacionarias son más resistentes a agentes físicos (frío, calor, radiación) y a químicos.

**1.-** Hay una **fase de latencia** que depende del medio si pasan a un medio diferente tienen que adaptarse y esto constituye la fase de latencia. Las células no crecen

**2.-** Luego, tras la adaptación, las células crecen de manera logarítmica, crecen con una  $\mu$  típica de cada especie. Esta fase se llama **exponencial o logarítmica**.

Ej. *Salmonella typhi* = 20-30'

Ej. *Mycobacterium tuberculosis* = 0.5-1 día.

**3.-** después de un tiempo se agotan los nutrientes y entran en la **fase estacionaria**, estas células son de menor tamaño, más resistentes y comienzan a desarrollar un metabolismo secundario, suelen tener crecimiento desequilibrado ya que poseen paredes más gruesas. Las mismas que mueren se dividen, es estacionario. Hay un crecimiento crítico.

Las células dependen de ciertos genes de supervivencia (genes *sur*), los mutantes *sur<sup>-</sup>* mueren rápidamente al llegar a la fase estacionaria.

**4.-** Luego llega un momento en el que no hay nutrientes y hay tantos desechos que se mueren, esta muerte también es exponencial (se detecta por recuento en placa).

### CRECIMIENTO DIAUXICO:

Este tipo de crecimiento ocurre cuando se ponen 2 azúcares diferentes (glucosa y lactosa), cuando hay glucosa el operón de la lactosa está reprimido y la célula crece exponencialmente usando la glucosa. Cuando la glucosa se termina hay una segunda fase en la que se expresan los genes para degradar la lactosa y crece en presencia de lactosa.

### CRECIMIENTO SINCRÓNICO:

Todos los microorganismos se encuentran en la misma fase del ciclo celular, en la misma fase de crecimiento, por lo que al medir algo en el cultivo es como si lo hiciéramos en una sola célula ya que son todas iguales.

#### Métodos de sincronización:

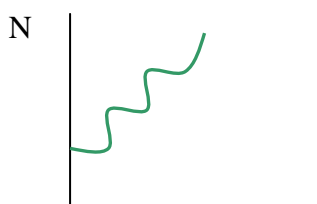
\* 1.- M. de inducción: Se induce artificialmente. Si quitamos la timina todas las células se paran en la duplicación de DNA, si añadimos T todas andan al mismo tiempo. También se puede hacer con mutantes sensibles a la temperatura ( $37^{\circ}\text{C} \rightarrow 24^{\circ}\text{C}$ ).

No son buenos métodos ya que una célula que llega antes al punto donde, por ejemplo se para la duplicación, tiene que esperar y no es totalmente inmune.

\* 2.- M. de Selección: Se selecciona por diferencia en densidad (flujo continuo y elutriación), o también se puede hacer por filtración e inversión de filtro. Es la separación física de células de la misma edad.

Para hacerlo se pone un filtro al que se han adherido las células. Hay células grandes y pequeñas. Si recogemos durante 3' cogemos las recién formadas. Tras un tiempo cogemos durante otros 3'. La densidad varía con el ciclo celular.

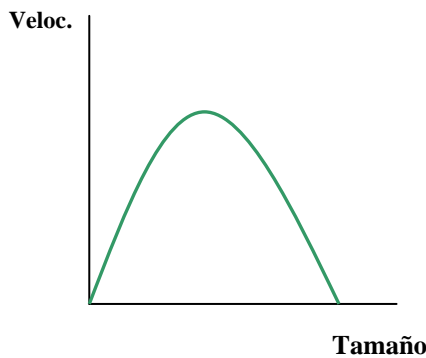
Se suelen coger células recién nacidas.



No todas las células son iguales, se pierde sincronía (no todas las células se dividen al mismo tiempo o a la misma edad). A partir de la pérdida de velocidad de sincronía se puede determinar la

distribución de velocidad de crecimiento de las células.

.- Con un contador Coulter se puede tener la distribución del tamaño.



Según el tamaño de la célula la velocidad varía, así las células pequeñas crecen más lentamente que las medianas que son las que alcanzan mayor velocidad, mientras que a las más grandes les pasa lo mismo que a las pequeñas y crecen más lentamente.

.- Otro cálculo permite estimar la distribución de las células de diferentes edades en cultivos con crecimiento exponencial. La mayoría se dividen a una determinada edad y predominan los individuos jóvenes, característica del crecimiento poblacional en expansión.

### EFICIENCIA DEL CRECIMIENTO: RENDIMIENTO

Es el incremento del peso entre la cantidad de nutriente consumida.

$Y = (X - X_0) / C$  Siendo  $X$  el peso seco/ml y  $C$  la concentración de nutrientes limitado.

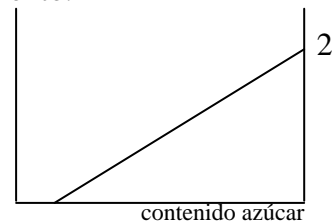
El rendimiento es la masa de células producidas partido por la unidad de nutriente limitante.

Cuanto más pongamos de alimento mayor es el crecimiento.

$Y = 2/5 = 0.4$  eficiencia del crecimiento.

Esto se usa en ensayos, con baja concentración.

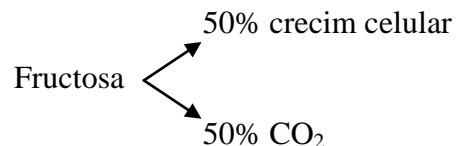
Si una vitamina es esencial para un organismo y se pone el organismo en un medio de cultivo, crece hasta un momento y eso es lo que tiene de vitamina (hay un modelo patrón) a esto se le llama ensayo o bioensayo.



1mg fructosa = 0.4mg crecimiento celular

1mg fructosa = 0.2mg crecimiento celular

0.4mg fructosa = 0.2mg crecimiento celular



El rendimiento para un azúcar varía entre el 20% y el 50% dependiendo de la eficiencia en obtener ATP.

Ejemplos:

	ATP/mol gluc.	Crecimiento molar	
		$Y_{gluc.}$	$Y_{ATP\ produc.}$
<i>S. cerevisiae</i>	2	21	10.5
<i>X</i>	1	8.6	8.6

*X* gasta más glucosa para obtener la misma energía que *S. cerevisiae* por lo que tiene menor crecimiento. Generalmente se mantiene  $Y_{ATP}$  ya que se requiere sintetizar energía para reacciones metabólicas.

La energía metabólica es la misma en un ejemplo, aunque unos sintetizan más ATP que otros. La energía metabólica usada en la formación de ácidos nucleicos es la misma para todos los casos.

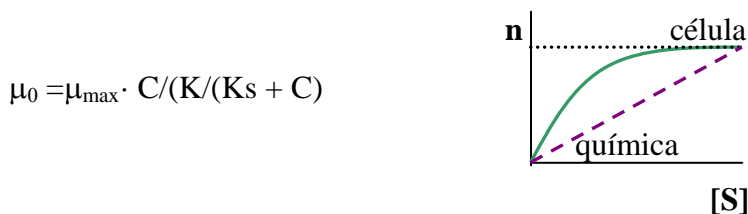
## **TEMA 14.- SISTEMAS DE CRECIMIENTO CONTROLADOS DE MICROORGANISMOS.**

### **EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES EN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO.**

En el crecimiento bacteriano los compuestos del medio se convierten en células. El crecimiento bacteriano es como una reacción química. En una reacción química se convierte en producto.

En bacterias la velocidad de crecimiento sigue una cinética de Michaelis-Menten. La velocidad de crecimiento respecto a la concentración de sustrato varía debido a que las células tienen permeasas por lo que las células a baja concentración de sustrato mantiene una velocidad constante (cinética enzimática). A muy baja concentración de sustrato las permeasas no son capaces de tener saturado el interior y la velocidad de crecimiento se hace proporcional a la concentración de sustrato.

A concentración de sustrato saturante existe una velocidad máxima, a muy baja concentración del sustrato tiene una velocidad de crecimiento proporcional a dicha concentración.



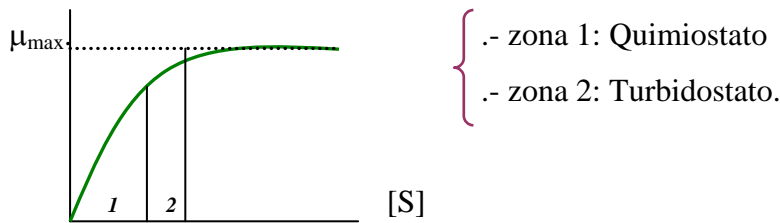
$K_s$  es la constante análoga a  $K_m$  y mide la afinidad de las permeasas por el sustrato.  $\mu_0$  es la velocidad de crecimiento en un momento determinado y  $\mu_{\max}$  es las permeasas saturadas.

### **CULTIVO CONTINUO**

Al cultivar en un matraz los nutrientes se agotan rápidamente y se estabilizan rápidamente, por lo que la fase exponencial dura poco. Para estudiarlo se puede añadir sustancias a velocidad exponencial (imposible) o se podría añadir sustancias retirando a su vez células y sustrato en exceso, esto se consigue mediante dos aparatos:

1.- El quimiostato: donde la  $\mu_0 < \mu_{\max}$ . La concentración de nutrientes es limitante.

2.- Turbidostato: La concentración de nutrientes se halla en exceso y  $\mu_0 \approx \mu_{max}$ .



♦ El **QUIMIOSTATO** tiene un reservorio con elevada concentración de nutrientes, tiene una llave que regula el flujo de paso. Luego hay un rebosadero con sifón por donde van saliendo células y sustrato.

Al inocular  $\mu_0 = \mu_{max}$  empiezan a crecer las células a su velocidad máxima, pero si se va acabando el nutriente esencial  $\mu$  se hace proporcional a la concentración de nutrientes y esta concentración se regula por el flujo. A mayor flujo mayor concentración de nutrientes y viceversa, al aumentar la concentración de nutrientes se incrementa el número de células (X).

En la práctica el flujo se ajusta a una velocidad y X se ajusta al flujo. Si aumenta X la concentración de nutrientes disminuye por tanto, baja la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y por lo tanto baja X (se regula).

$X \downarrow \rightarrow [nutrientes] \uparrow \rightarrow \mu \uparrow \rightarrow X \uparrow$  Se estabiliza solo.

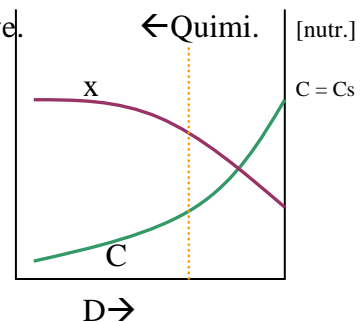
Nº células producidas es:  $dx/dt = \mu \cdot X$   
 Nº células perdidas es:  $dx/dt = D \cdot X$  } La producción neta en el quimiostato es:  
 $dx/dt = (\mu - D) \cdot X$

X es la densidad poblacional.

D es la velocidad de dilución =  $f/V$  ( $h^{-1}$ ) donde f es el flujo y V el volumen.

$\mu > D \rightarrow X$  aumenta  $\rightarrow C$  disminuye y  $\mu$  también disminuye.  
 $\mu < D \rightarrow X$  disminuye  $\rightarrow C$  aumenta y también  $\mu$   
 $\mu = D \rightarrow$  Existe equilibrio.

En el quimiostato a menor velocidad de dilución la concentración de células varía poco.



$$D = \mu_{max} \cdot C / (K_s + C) \quad C = K_s \cdot D / (\mu_{max} - D)$$

[RELACIÓN ENTRE C Y D]

A mayor velocidad de dilución aumenta la concentración de sustrato dentro. Cuando D es muy grande se iguala la concentración dentro del matraz y en el reservorio del aparato (asíntota en el infinito).

### RELACIÓN ENTRE X Y D

El sustrato añadido es igual al consumido más el perdido. El añadido es  $C_r \cdot D$  siendo  $C_r$  la concentración en el reservorio.

$(C_r \cdot D) = dC/dt + (C \cdot D) \rightarrow$  sustrato consumido + sustrato perdido.

$C_r \cdot D = dC/dX \cdot dX/dt + CD$  [dC/dX es la inversa del crecimiento (1/y) y

$dX/dt = \mu \cdot X$ ]

$C_r \cdot D = 1/y \cdot \mu \cdot X + CD$

En un estado sostenido  $\mu = D$  (equilibrio)

$X = y(C_r - C) = yC_r - yK_s \cdot D / (\mu_{\max} - D)$

Cuando tenemos las células en crecimiento si regulamos D podemos obtener cualquier estado sostenido. El tiempo de generación va disminuyendo, la salida de bacterias aumenta hasta un punto en el que disminuye, cuando  $D = \mu_{\max}$  X se viene a cero y las bacterias bajan, salen más rápidamente. El cultivo se lava. Por ello existe un rango dentro del quimiostato para trabajar (sin D grande).

♦ El **TURBIDOSTATO** mide absorbancia, se ajusta la velocidad de flujo respecto a la absorbancia y la velocidad de crecimiento se ajusta a la velocidad de flujo.

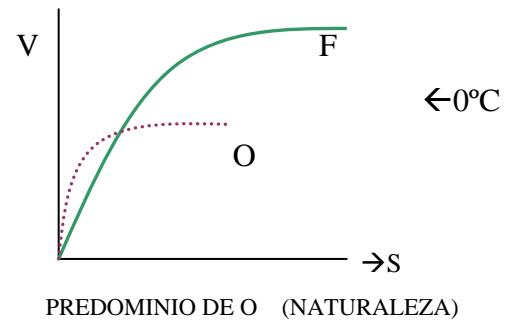
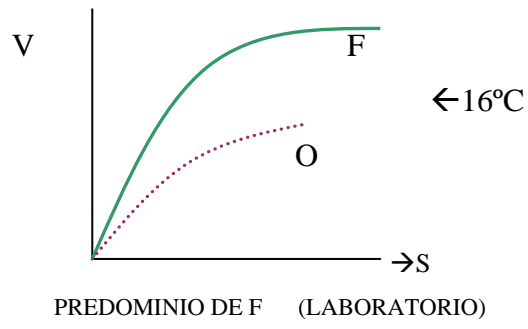
A mayor D la absorbancia aumenta mucho (varia mucho) la máxima sensibilidad se halla a grandes D, dentro del rango en el que X cambia mucho con D. Hay un peligro de lavado.

Cuando la concentración de nutrientes baja mucho la célula los usa para mantenerse viva sin dividirse, esto puede dar lavado de células.

### APLICACIONES:

- 1.- Para obtener células en fase exponencial siempre ( $\mu = cte$ ).
- 2.- Para regular los factores limitantes.
- 3.- Para seleccionar mutantes con mayor velocidad máxima. Se pone  $D = \mu_{\max}$  y las células se lavan excepto los mutantes.

4.- En estudios ecológicos.



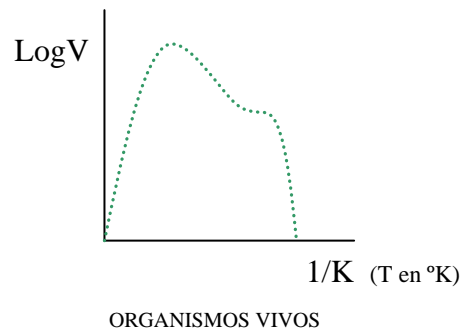
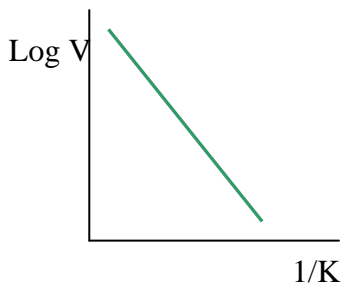


## **TEMA 15.- EFECTO DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.**

### **EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO MICROBIANO**

La velocidad de una ecuación química la determina la temperatura

$$\text{LogV} = -\Delta N / 2.303 \cdot RT \quad (\text{T en } ^\circ \text{kelvin})$$



Existe caída brusca al llegar a los extremos.

- Las T cardinales son:

La **T máxima** que aumenta con la T hasta un punto en el que se inactivan enzimas necesarias.

La **T mínima** que está determinada por la fluidez de la membrana plasmática. La membrana pasa a ser solidificada.

La **T óptima** que es la cercana a la máxima ( $\mu_{\max}$ )

Los valores numéricos varían según el microorganismo:

- 1.- Psicrófilos: -5 - 20°C
- 2.- Mesófilos: 18 - 45°C
- 3.- Termófilos: 42 - 68°C
- 4.- Termófilos extremos 65 - 105°C

### **1.- PSICRÓFILOS**

Abundan en los océanos, Ártico y Antártico. Existen dos ambientes fríos:

- **Frío todo el año**: psicrófilos obligados. Crecen a 0°C y su T óptima es 15°C. No crecen en regiones templadas.

- **Frío en invierno solamente**: psicrófilos facultativos. Crecen a 0°C pero su T óptima es 20-30°C. Son psicrotolerantes y viven en regiones templadas más distribuidos que los

psicrófilos puros. Son los microorganismos que contaminan los alimentos refrigerados. Crecen lentamente. Ej: *Chlamydomonas*.

### Factores que dan resistencia al frío:

- Los psicrófilos poseen enzimas eficaces a baja temperatura.
- Tienen membrana fluidas a baja temperatura porque contienen mayor cantidad de ácidos grasos insaturados (cuanto más enlaces dobles menor fuerza de unión). Al enfriarse la membrana se congela y pasa a ser sólida porque aumentan las interacciones hidrofóbicas, con ácidos grasos insaturados las interacciones son más débiles y el punto de transición a sólido es menor.
- La congelación (-70°C) evita el crecimiento.

### 2.- MESÓFILOS

Viven en regiones templadas.

Ej: *E. coli* {
 

- Temperatura mínima es de 8°C
- La T óptima es de 39°C.
- La T máxima es de 48°C

### 3.- TERMÓFILOS

Crecen a temperaturas superiores a 35-48°C. Crecen en suelos calentados por el sol, materia orgánica fermentada, con fenómenos de vulcanismo, fuentes termales, fumarolas, chimeneas negras de los océanos, etc.

En Yellowstone es donde existe mayor número de fuentes termales. El agua se va enfriando según avanza por el terreno.

Los procariotas alcanzan mayor temperatura que los eucariotas ya que estos tiene *mitocondrias* y *cloroplastos* cuyas membranas son sensibles a altas temperaturas. Por la misma razón, los organismos no fotosintéticos aguantan mayor temperatura que los fotosintéticos.

Las especies más termófilas son las Arqueobacterias.

### Factores que dan resistencia al calor:

A) Los enzimas y proteínas son más estables por cambios en algún aminoácido. Esto aumenta la resistencia a la T.

Existen puentes salinos de sodio y otros cationes.

Las proteínas tienen mayor nº de residuos hidrofóbicos interiores que mantienen la estructura estable.

B) Los ribosomas y la membrana plasmática también son más estables.

.- Incrementan los ácidos grasos saturados aumentando la fuerza de interacción (a diferencia de los psicrófilos).

- Si realizamos un cultivo de bacterias a 100°C nos encontramos que el 80% de las proteínas que sintetizan son Chaperoninas que pliegan a las proteínas cuando éstas van a desnaturalizarse.

BIOTECNOLOGÍA: Se usan para trabajar a temperaturas altas enzimas de hipertermófilos para sintetizar sustancias. Los procesos son más rápidos a elevada temperatura:

- .- Mayor solubilidad
- .- Mayor velocidad de difusión.
- .- Menor concentración bacteriana.
- .- Menor nº de cortes de enfriamiento.

(Ej: Taq-polimerasa.)

### Ecología de termófilos.

Tiempo generacional (G) es de 2-7h. Viven en biotopos naturales o artificiales:

1.- B. Naturales: Además de las asociadas a vulcanismo también viven en nichos en rocas sedimentarias profundas de la corteza terrestre.

2.- B. Artificiales: Existen en plantas acuáticas industriales y también en pilas de desecho del carbón.

### Ejemplos.

Hipertermófilos eucariotas {  
.- *Thermotoga*  
.- *Aquifex*

Arqueobacterias {  
*Pyrodictium* (sobrevive en autoclave 1h. a 120°C)  
*Methanopyrus*.  
*Pyrolotus*

Todos los termófilos están en las ramas más cortas y profundas del árbol de la vida.

Probablemente los primeros seres vivos fueron hipertermófilos de las arqueobacterias.

### **Problemas:**

1) Estabilidad del DNA:

.- El DNA está protegido por altas concentraciones de soluto como el 2,3-difosfatoglicerato.

.- Existen proteínas que ayudan a plegarse al DNA de forma especial.

.- En determinados casos existen proteínas que ayudan en la transcripción. Es una histona que abre la cadena de DNA.

.- La estabilidad de los monómeros que aguantan elevada temperatura.

### **ACTIVIDAD DEL AGUA**

.- El agua es necesaria para la vida.

.- La accesibilidad del agua para una célula la determina la cantidad de soluto que exista disuelto. Esto lo determina la actividad del agua.

.-  $a \cdot w = 1$  para el agua pura. Al poner agua en una campana y medir la humedad relativa vemos que si no es pura se alcanza un 80% de humedad relativa, la actividad es 0.8. Si el soluto tiene carga la actividad disminuye. Un 20% NaCl = 80% sac.

Los iones parece que retienen el agua y no dejan que la célula acceda a ella.

.- Cuando en la célula la concentración interna de solutos es mayor que la externa el agua tiende a entrar.

.- Cuando la P osmótica interna es mayor a la externa la célula se hincha aunque no estalla debido a la pared celular. Si la P osmótica interna es menor a la externa el agua tiende a salir y la célula se arruga y muere, esto es la **plasmolisis**.

La célula tiene que acumular solutos dentro.

### **MICROORGANISMOS OSMOFÍLICOS: MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA P OSMÓTICA INTERNA:**

Los microorganismos que crecen con elevadas concentraciones de azúcares se les llama **osmofílicos** mientras que a los que crecen con elevadas concentraciones de

sales se les llama **halófitos**. A aquellos que crecen donde no existe agua se les llama **xerófitos** o **xerofílicos**.

### Solutos compatibles:

Son los solutos que se acumulan en el citoplasma para ajustar su actividad de agua, no debe ser inhibitorio para la bioquímica celular. (pág. 170 Brock).

Lo primero que acumula un microorganismo es potasio.

Al aumentar la **P osmótica** aumenta la **fuerza iónica** que determina la actividad de las enzimas. Algunos microorganismos siguen acumulando  $K^+$  (elevada fuerza iónica) y secretan iones orgánicos divalentes (sin elevada P osmótica). Incorporan  $K^+$  y secretan iones divalentes de manera que aumenta la P osmótica sin aumentar la fuerza iónica.

Existe un límite en la introducción de  $K^+$  llamado **tolerancia osmótica**. Llega un momento en el que no se puede acumular más  $K^+$  y entonces acumulan un no-electrolito, no sube la fuerza iónica. El límite lo daría la mínima actividad del agua que pueden soportar.

Substratos que acumulan	{	Glicerol Manitol Sorbitol
-------------------------	---	---------------------------------

### Clasificación según la concentración de iones:

.- No halófitos → Sin sales  $[NaCl] < 0.1 M$

.- Ligeramente halófitos.  $[NaCl] = 0.2-0.5 M$  Act. Agua = 0.8

Muchos son marinos.

.- Halófitos moderados  $[NaCl] = 0.5-2.5 M$  Aguantan act agua de 0.5

Son Cocos Gram + y algún microorganismo Gram -.

.- Halófitos frontera.  $[NaCl] = 1.5-3.5 M$

Se hallan en lagos salinos. Acumulan solutos compatibles como la glicina, bataína o ectoína.

.- Halófitos extremos.  $[NaCl] = 2.5-5.2 M$  viven a concentraciones saturadas de NaCl del 20-30%. Viven en salinas.

Usan  $K^+$  como sustrato compatible. Usan sodio.

Pertenecen al grupo Arquea, p.ej. géneros *Halococcus* y *Halobacterium*.

.- Halotolerantes: toleran sal pero no la requieren:

Extremadamente halotolerantes:  $[NaCl] = 2.5 M$

Acumulan mucha prolina para evitar la subida de la P osmótica externa.

.- Xerófitos: Viven en ambientes secos. Son sobre todo hongos. Soportan un límite de agua de  $a_w = 0.6-0.7$ . aguantan menor actividad del agua que las bacterias, usan como soluto compatible el glicerol.

### **Función de iones en halófitos extremos:**

- 1.- Usan los iones para el transporte.
- 2.- Las enzimas no son activas si no poseen sales.
- 3.- Los iones estabilizan los ribosomas.
- 4.- Dan estabilidad a la pared.

Si disminuye la concentración del NaCl añadiendo agua pura las bacterias se redondean, y si disminuye mucho la concentración la célula estalla. El NaCl se diluye, la rigidez de la pared disminuye y las células se lisan.

## **ACIDEZ Y BASICIDAD**

(pág. 168 del Brock)

.- En ambientes naturales el pH =5-9. A pH diferente crecen microorganismos distintos.

→ Acidófilos: levaduras.

→ Basófilos: la mayoría de las bacterias.

pH <2 { .- Excepciones de bacterias que crecen en ambientes ácidos es *Thiobacillus* que son acidófilos, usan  $\text{SH}_2$  como dador de electrones y lo oxidan a  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .  
.- *Sulfolobus* produce  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .  
.- *Thermoplasma*.

Si sube el pH la membrana se disuelve y no funcionan (pH neutro).

→ Bacterias lácticas: dan ácido láctico y aumentan el pH. Crecen mejor en pH neutro o poco alcalino aunque produzcan ácido constantemente.

## **EL OXÍGENO**

(Pág. 171 del Brock).

Es el principal aceptor de electrones originando agua. El gasto de  $\text{O}_2$  da el paso de ambiente oxidante a reductor.

La *disponibilidad del  $\text{O}_2$*  y la *actividad microbiana* determinan  $E'_0$  (potencial energético).

\* Nichos anaeróbicos con bajo  $E'_0$ :

- Tracto digestivo
- Aparatos industriales.

\* Nichos anaeróbicos artificiales:

- Llenar tubos.
- Añadir agentes reductores (tioglicerato).
- Campanas de anaerobios.
- Jarras de anaerobios.

### **Tipos de microorganismos:**

.- Aerobios: viven en 20% de  $O_2$ .

Microaerófilos 2-9% de  $O_2$ .

.- Anaerobios facultativos.

.- Anaerobios obligados: mueren en presencia de  $O_2$ .

.- Anaerobios aerotolerantes: no usan  $O_2$  pero lo toleran.

El  $O_2$  tiene  $2e^-$  desapareados en sus orbitales exteriores, mayor potencial REDOX y mayor poder de oxidación.

El estado normal del  $O_2$  es el estado triplete (espines paralelos y  $e^-$  desapareados). El estado singlete posee espines antiparalelos y  $e^-$  desapareados.

La mayor reactividad del singlete es por los espines antiparalelos, se produce menor fotoquímica en organismos expuestos a la luz.

$O_2$  en triplete + luz + colorante  $\rightarrow O_2$  singlete.

.- Bioquímica: lo usan los leucocitos (fagocitos). Actúan la mieloperoxidasa y la lactoperoxidasa:

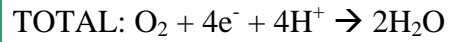
$H_2O_2$  + lactop./mielop.  $\rightarrow O_2$  singlete.

El  $O_2$  capta electrones para completar la capa externa. Cuando gana un  $e^-$  se convierte en el *ion superóxido* ( $O_2^-$ ). En medio ácido está como  $HO_2^-$  (no ionizado). El superóxido se forma en la respiración, es un agente muy reactivo, puede pasar de una célula a otra.

Cuando gana otro  $e^-$  da *agua oxigenada* con  $8e^-$  en la capa externa ( $H_2O_2$ ), éste es un buen oxidante, se forma en la respiración en baja cantidad.

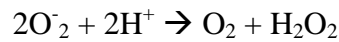
Cuando gana otro  $e^-$  se disocia y un átomo de  $O_2$  pasa a formar  $H_2O$ , el otro queda dando el radical hidroxilo  $OH^\cdot$ , altamente reactivo.. Se forma por radiación ionizante, se cambia con DNA y da muerte celular (rad  $\gamma$ ).

Cuando gana otro electrón se forma el agua.



Los aerobios no se mueren por acción de estos radicales porque tiene defensas, enzimas que destruyen los intermediarios nocivos:

.- **Superóxido dismutasa:** destruye el ion superóxido que son muy nocivos.



La poseen todos los aerobios

El agua oxigenada también es nociva y es destruida por dos enzimas:

1.- **Catalasa:**  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ .

La tienen todos los aerobios y algún aerobio tolerante (aerotolerantes como las bacterias lácticas). Los anaerobios no la tienen. (*pregunta de test*)

2.- **Peroxidasa:**  $H_2O_2 + \text{comp. orgánico}/NADH + H^+$ . Los aerotolerantes usan un compuesto orgánico. No poseen superóxido dismutasa.

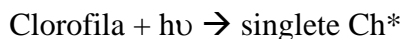
Tienen un complejo de  $Mn^{2+}$  unidos a proteínas que destruyen el ion superóxido que funciona como una superoxidasa dismutasa (ésta tiene también  $Mn^{2+}$  en el centro).

→ Los anaerobios aerotolerantes que no tienen catalasa tienen superóxido dismutasa.

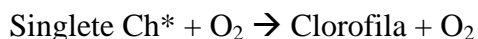
Mutantes de superóxido dismutasa mueren en presencia de  $O_2$ , tienen que fermentar.

## ORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS.

Para protegerse contra el singlete:



El microorganismo tiene carotenoides que atenúa la energía que ha tomado el singlete y permite la vida con luz.

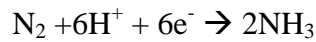


Los carotenoides transforma los singletes en formas no tóxicas. Casi todos los microorganismos de regiones iluminadas poseen pigmentos que defienden contra el efecto singlete.



**AEROBIOS Y ENZIMAS SENSIBLES AL O<sub>2</sub>**

1) Los aerobios tienen **nitrogenasa** que fija N<sub>2</sub>.



La nitrogenasa tiene que protegerse contra el O<sub>2</sub>. Los microorganismos que no protegen la enzima y son anaerobios facultativos sólo fijan N<sub>2</sub> en anaerobiosis.

2) **Oxigenasas**: El O<sub>2</sub> es su sustrato. La oxigenasa abre los ciclos de compuestos aromáticos que pasan a compuestos alifáticos.

Ej. *Pseudomonas* sólo usa sustratos aromáticos en aerobiosis aunque pueda vivir con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como aceptor de e<sup>-</sup>.

.- Eucariotas: existe síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados requiere la oxigenasa.

Las levaduras necesitan estos compuestos.