

3 | Fisiología y metabolismo bacteriano

G. Varela, G. Grotiuz

Las bacterias son los organismos más pequeños que tienen la maquinaria requerida para el crecimiento y la replicación. Están compuestas, como las células eucariotas, por proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos, entre otros. Estas macro-moléculas pueden formar parte de estructuras celulares más complejas, como la pared celular y la membrana plasmática. El crecimiento bacteriano se define como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de la célula. Es un proceso complejo que supone la replicación de todas las estructuras y componentes celulares a partir de nutrientes exógenos.

El conocimiento de la fisiología y del metabolismo bacteriano tiene algunas aplicaciones prácticas. En principio permite conocer el modo de vida y el hábitat de diferentes especies bacterianas. El ser humano actuando como huésped, ofrece una variedad de nichos ecológicos que se diferencian entre sí por aspectos físicos y químicos (temperatura, concentración de oxígeno, pH, presión osmótica, etc.), en los cuales pueden crecer y multiplicarse distintas especies bacterianas según sus requerimientos nutricionales, ambientales y atmosféricos. Además, permite formular medios de cultivo para el aislamiento e identificación de los patógenos participantes. Desde un enfoque terapéutico, nos permite conocer y entender el modo de acción de algunos antibióticos que bloquean una vía metabólica o la síntesis de alguna macromolécula esencial para la bacteria.

El término metabolismo se refiere al conjunto de reacciones químicas que se producen en la célula y tiene tres funciones específicas. La primera es obtener energía química del entorno y almacenarla, para luego usarla en diferentes funciones celulares. La segunda es convertir los nutrientes exógenos en unidades precursoras de los componentes macromoleculares de la célula bacteriana. Y la tercer función es formar y degradar moléculas necesarias para cumplir funciones celulares específicas, por ejemplo: movilidad y captación de nutrientes.

El metabolismo se produce por secuencias de reacciones catalizadas enzimáticamente y se divide en anabolismo y catabolismo. El proceso por el cual la célula bacteriana sintetiza sus propios componentes se conoce como anabolismo y resulta en la producción de nuevo material celular; también se denomina biosíntesis. La biosíntesis es un proceso que requiere energía, por lo tanto las bacterias deben ser capaces de obtenerla de su entorno para crecer y, eventualmente, multiplicarse. El conjunto de reacciones degradativas de los nutrientes para obtener energía o para convertirlos en unidades precursoras de la biosíntesis, se conoce como catabolismo.

Así, hemos visto dos tipos de transformaciones químicas que ocurren simultáneamente en la bacteria, por lo tanto el metabolismo es el resultado colectivo de ambas reacciones.

Las catabólicas resultan en la liberación de la energía química contenida en los nutrientes, mientras que las anabólicas la consumen. Por lo tanto, la energía liberada como resultado de las reacciones de oxidación reducción del catabolismo, debe ser almacenada y transportada de alguna manera. Una de ellas es como compuestos con uniones fosfato de alta energía; dichos compuestos luego se usan como intermediarios en la conversión de la energía conservada en trabajo útil. El compuesto fosfato de alta energía más importante en los seres vivos es el trifosfato de adenosina (ATP). Éste se genera en la célula bacteriana por dos procesos diferentes: fosforilación a nivel del sustrato y fosforilación oxidativa.

Metabolismo productor de energía

En los seres vivos, la utilización de la energía potencial contenida en los nutrientes se produce por reacciones de oxidación reducción. Químicamente la oxidación esta definida por la pérdida de electrones y, la reducción por la ganancia de los mismos. En bioquímica, estas reacciones frecuentemente incluyen también la transferencia de átomos enteros de hidrógeno, por lo tanto se conocen con el nombre de reacciones de deshidrogenación. En las reacciones de este tipo hay sustancias que ceden electrones (dadoras) y otras que los aceptan (aceptoras). En las bacterias de interés médico los sistemas de oxidación reducción transforman la energía química de los nutrientes en una forma biológicamente útil; dichos procesos incluyen la fermentación y la respiración. En la primera, tanto la molécula dadora como la aceptora de electrones, son compuestos orgánicos. En cambio, en la respiración hay un aceptor final exógeno, que cuando es el oxígeno se denomina respiración aerobia y cuando es un compuesto inorgánico, respiración anaerobia.

FERMENTACIÓN

En ésta los electrones pasan del dador, un intermediario formado durante la degradación del sustrato, hacia un aceptor constituido por algún otro intermediario orgánico también generado durante el catabolismo del sustrato inicial. Por lo tanto, este proceso de oxidación reducción no requiere el aporte exógeno de un aceptor final de electrones.

Aunque hay distintos tipos de fermentaciones, todas llevan a una oxidación parcial de los átomos de carbono del sustrato inicial y liberan, por lo tanto una pequeña parte de la energía potencial contenida (Ver figura 1). El rendimiento energético de este proceso es menor que el de la respiración.

En las bacterias se encuentran las tres vías centrales del metabolismo intermediario de los hidratos de carbono: la glucolítica o de Embden Meyerhof Parnas, la de pentosa fosfato o shunt de las pentosas y la de Entner-Doudoroff.

La vía glucolítica que degrada la glucosa se divide en tres etapas principales. La primera es preparativa, con reacciones que no son de oxidación reducción, sin liberación de energía y con formación de dos intermediarios de tres átomos de carbono cada uno. En la segunda etapa, sí ocurren reacciones de oxidación reducción con liberación de energía, formación de ATP por fosforilación a nivel del sustrato (el ATP se genera en un paso enzimático específico) y producción de dos moléculas de piruvato. En la tercer etapa, nuevamente ocurren reacciones de oxidación reducción y se generan los productos finales de la fermentación, que varían según la bacteria en cuestión. Solo una pequeña parte de la energía libre que potencialmente puede derivar de la degradación de una molécula de glucosa queda disponible por esta vía, dado que los productos finales son compuestos en los que el carbono se encuentra todavía en estado reducido.

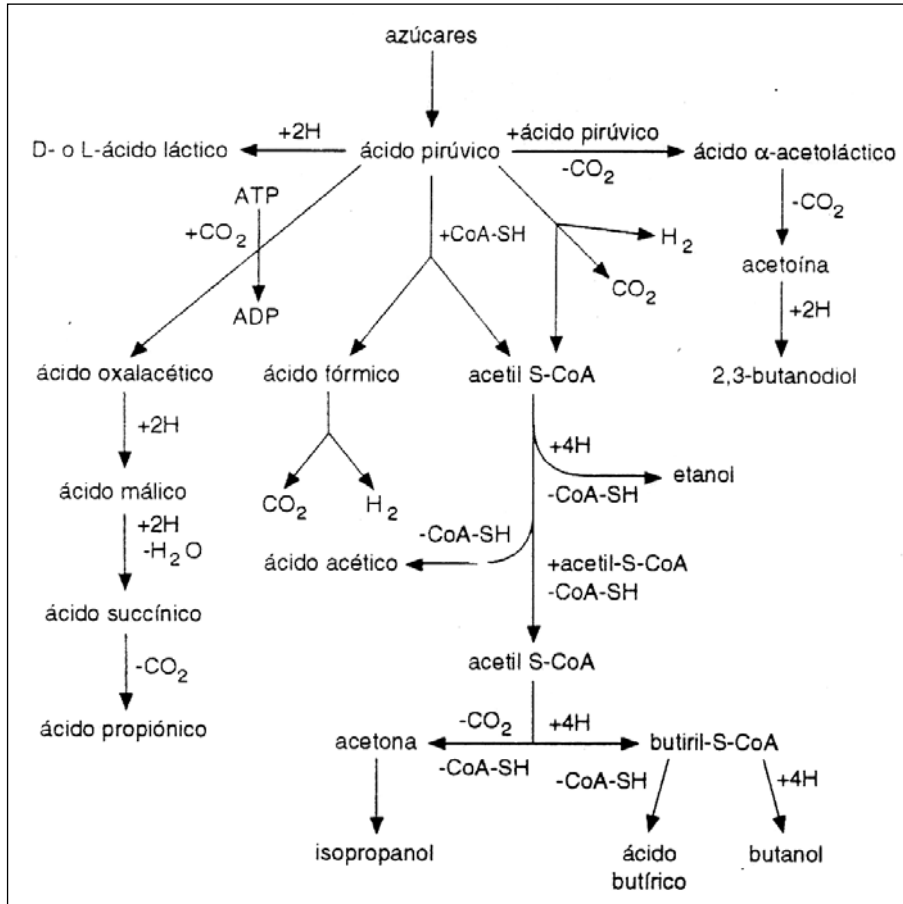


Figura 1. Rol central del piruvato en las fermentaciones

Por cada molécula de glucosa que entra a esta vía, se forman cuatro moléculas de ATP y como se consumen dos en la primer etapa, el balance neto es de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa fermentada. El destino final del metabolito clave, el piruvato, depende de los procesos empleados para la regeneración del dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) a partir del dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH) y así mantener el equilibrio de oxidación reducción.

Aunque la vía glucolítica es la más importante en las células eucariotas y procariotas, no es la única. La vía de las pentosas es una ruta multifuncional para la degradación de hexosas, pentosas y otros hidratos de carbono. Para los fermentadores heterolácticos es la principal fuente productora de energía, aunque la mayoría de las bacterias usan esta vía como fuente de dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reducido (NADPH) y de pentosas para la síntesis de nucleótidos.

La vía de Entner-Doudoroff es la ruta principal para la degradación de la glucosa en las bacterias aerobias estrictas como *Neisseria* y *Pseudomonas*. Como sucede en la vía de las pentosas, aquí solo se produce una molécula de ATP por molécula de glucosa degradada.

El ácido pirúvico derivado de la glucosa, es un compuesto clave en el metabolismo fermentador de los hidratos de carbono. En su formación, el NAD es reducido a NADH y éste

debe oxidarse nuevamente a NAD para alcanzar el equilibrio final de oxidación reducción. Las bacterias se diferencian de las células eucariotas por la forma en que eliminan el piruvato; en las bacterias la oxidación incompleta es la regla y se acumula gran cantidad de metabolitos finales de la fermentación. El estudio y el conocimiento de las fermentaciones bacterianas tiene importancia práctica, porque proporciona productos industriales que son útiles en el laboratorio para identificar las diferentes especies. Entonces, según los productos finales, tenemos diferentes tipos de fermentación: alcohólica, homoláctica, heteroláctica, del ácido propiónico, ácido mixta, de butanodiol y del ácido butírico.

Fermentación alcohólica

Es el tipo de fermentación más antigua que se conoce. Produce etanol a partir de glucosa. Aunque ciertas bacterias producen alcohol, éste es elaborado por otras vías.

Fermentación homoláctica

Todos los miembros del género *Streptococcus*, *Pediococcus* y muchas especies de *Lactobacillus* fermentan la glucosa fundamentalmente a ácido láctico con poca acumulación de otros productos finales. En esta reacción el piruvato se reduce a ácido láctico por acción de la enzima láctico deshidrogenasa, actuando el NADH como dador de electrones. Esto ocurre en la tercer etapa de la vía glucolítica.

Fermentación heteroláctica

En este tipo de fermentación solo la mitad de la glucosa se convierte en ácido láctico, el resto se transforma en una mezcla de anhídrido carbónico (CO₂), ácido fórmico, ácido acético, etc. En esta fermentación se emplea fundamentalmente la vía de las pentosas y se produce en las bacterias del género *Leuconostoc* y *Lactobacillus*.

Fermentación del ácido propiónico

Es característica de algunas bacterias anaerobias como el *Propionibacterium* (bacilo grampositivo, no esporulado). Este tipo de fermentación tiene la ventaja de que genera una molécula más de ATP.

Fermentación ácido mixta

Es característica de la mayoría de las enterobacterias. Bacterias como *Shigella*, *Salmonella* y *E. coli* fermentan las hexosas a través del piruvato a ácido láctico, ácido acético, ácido succínico y ácido fórmico.

Fermentación de butanodiol

Varias bacterias como *Enterobacter*, *Serratia* y *Bacillus* producen 2,3-butanodiol durante la fermentación de la glucosa. Este deriva de la condensación de dos moléculas de piruvato en una molécula neutra de acetoína que luego es reducida a 2,3-butanodiol.

Fermentación del ácido butírico

Se ve en bacterias del género *Clostridium* (bacilo grampositivo, anaerobio y esporulado).

Si bien hasta ahora nos hemos referido solo a la fermentación de hidratos de carbono como procedimiento para obtener energía, debemos destacar que otros compuestos orgánicos pueden ser fermentados, por ejemplo: aminoácidos (alanina, glicina). En *Clostridium* proteolíticos, la fermentación de aminoácidos más característica es la reacción de Stickland.

Anteriormente hemos discutido el metabolismo de los hidratos de carbono en ausencia de un aceptor externo de electrones y hemos visto que solo una pequeña parte de la energía potencial contenida en el sustrato es liberada. Esto se debe a que la diferencia entre los potenciales de oxidación-reducción entre la molécula dadora inicial y la aceptora final es muy pequeña. Otras bacterias tienen la capacidad de oxidar completamente el sustrato inicial a CO_2 por el proceso conocido como respiración.

RESPIRACIÓN

Es el proceso por el cual un sustrato es oxidado completamente a CO_2 y agua, con participación de una cadena de electrones ubicada en la membrana plasmática, en la cual el aceptor final es el oxígeno molecular u otro compuesto inorgánico (nitratos, sulfatos, anhídrido carbónico, etc.)—anaerobia—. Los primeros pasos en la respiración de la glucosa son idénticos a los de la glucólisis, pero mientras en esta última el piruvato es convertido en productos finales de la fermentación (ácido láctico, ácido propiónico, etc.), en la respiración es oxidado completamente a CO_2 mediante el ciclo de Krebs (ver figura 2). Por cada molécula de piruvato oxidada en este ciclo, se generan tres moléculas de CO_2 . Al igual que en la fermentación, los electrones generados en el ciclo de Krebs, pasan a coenzimas que tienen NAD. Sin embargo, en la respiración aerobia, los electrones del NADH son transferidos al oxígeno para regenerar NAD a través de un sistema transportador, en lugar de cederlos al piruvato.

SISTEMAS TRANSPORTADORES DE ELECTRONES Y GENERACIÓN DE TRIFOSFATO DE ADENOSINA

Estos sistemas están compuestos por transportadores (carriers) de electrones, asociados a la membrana plasmática y tienen dos funciones básicas: aceptar electrones de un donador y cederlos a un aceptor y conservar energía liberada durante ese transporte en forma de ATP por fosforilación oxidativa.

Existen varios tipos de enzimas de oxidación-reducción y proteínas transportadoras de electrones, entre los que se destacan las NAD-deshidrogenasas, las flavoproteínas y los citocromos. Las flavoproteínas contienen un derivado de la riboflavina como grupo prostético que se reduce y se oxida alternativamente. La riboflavina, conocida como vitamina B₂, es necesaria como factor de crecimiento por algunas bacterias. Los citocromos son proteínas que tienen anillos porfirínicos con hierro y también se oxidan y se reducen alternativamente. Hay diferentes tipos de citocromos que se distinguen por sus potenciales de reducción. Se los designa con letras a, b, c, etc. También están las quinonas, sustancias liposolubles relacionadas con la vitamina K, que participan en el transporte de electrones.

Para entender cómo se genera el ATP durante el transporte de electrones, debemos recordar su orientación con respecto a la membrana plasmática de la célula bacteriana. La cadena está ubicada como ya dijimos en la membrana plasmática, de tal modo que durante el proceso de transporte hay una separación física entre protones y electrones. Los protones quedan fuera de la célula, mientras que los electrones quedan dentro de ésta; en consecuencia se genera un gradiente de pH y un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática, estando el lado externo ácido y cargado positivamente y el interno alcalino y cargado negativamente. A pesar de su tamaño pequeño, ni los hidrogeniones, ni los hidróxidos atraviesan libremente la membrana; por lo tanto, el equilibrio no puede establecerse espontáneamente. Dicho estado energético de la membrana plasmática, similar a una batería, puede ser usado por la célula para realizar un trabajo útil, por ejemplo, movilidad o síntesis de ATP. Para la síntesis de ATP un componente fundamental del proceso es una ATPasa de membrana; enzima que cataliza

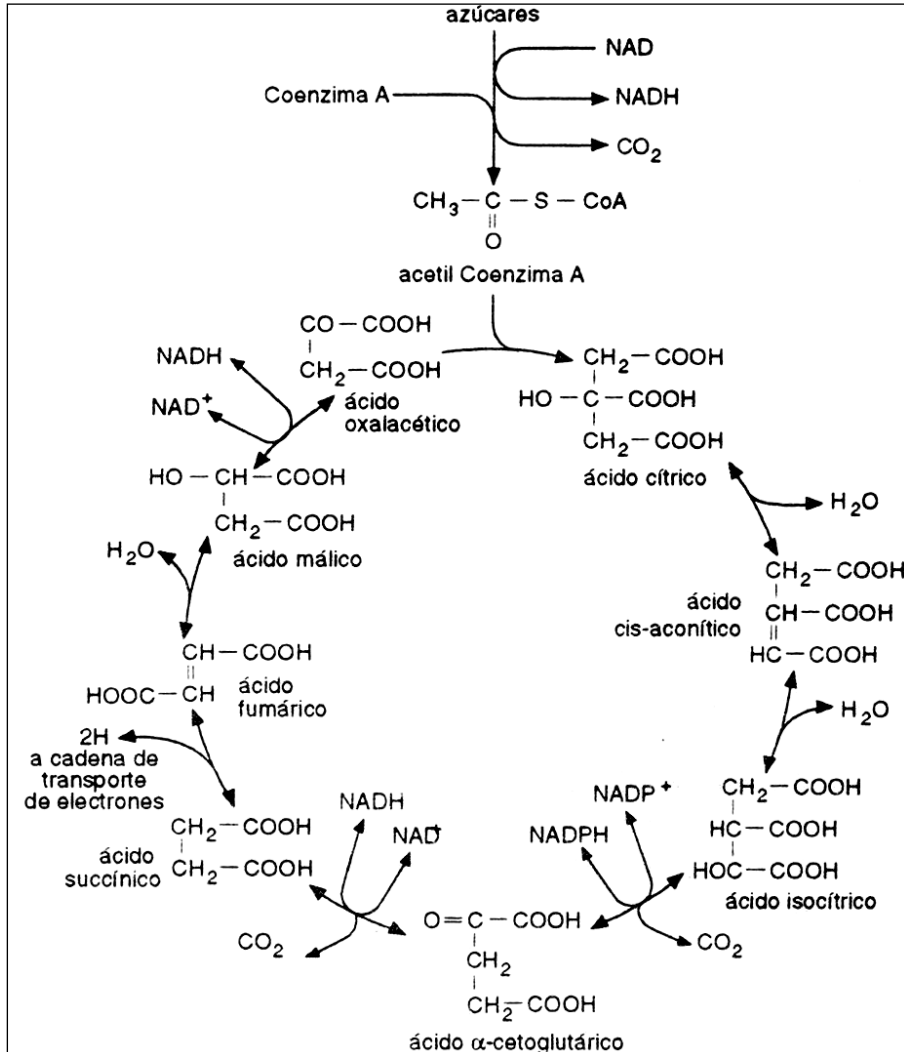


Figura 2. Ciclo de Krebs

la reacción reversible entre difosfato de adenosina (ADP) y ATP. Operando en una dirección y usando el gradiente de protones generado durante el transporte, dicha enzima cataliza la formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Existe una variedad de agentes químicos llamados desacopladores que inhiben la síntesis de ATP durante el transporte de electrones sin alterar el propio proceso de transporte. Ejemplos de estos agentes son el dicumarol y el dinitrofenol. Son sustancias liposolubles que impiden la formación del gradiente de pH y el eléctrico, favoreciendo el pasaje de protones a través de la membrana; de este modo inhiben la síntesis de ATP. La polimixina B (un antibiótico) se adhiere específicamente a la superficie externa de la membrana, alterando su estructura y propiedades osmóticas. Se produce entonces la pérdida de metabolitos y la inhibición de algunos procesos bioquímicos que tienen lugar a ese nivel, como el transporte de electrones y la síntesis de ATP, entre otros. Otras sustancias, por ejemplo: cianuro o azida de sodio, bloquean el propio sistema de

transporte y se denominan inhibidores. Tanto los desacopladores como los inhibidores son venenos celulares que actúan en células eucariotas y procariotas.

BALANCE ENERGÉTICO DE LA RESPIRACIÓN

El resultado neto de las reacciones del ciclo de Krebs es la oxidación completa del piruvato a CO₂ con formación de cuatro moléculas de NADH y una de dinucleótido de flavinadenina (FADH). El NADH y el FADH pueden ser oxidados nuevamente por el sistema transportador de electrones. Un total de 15 moléculas de ATP son sintetizadas en cada vuelta del ciclo,

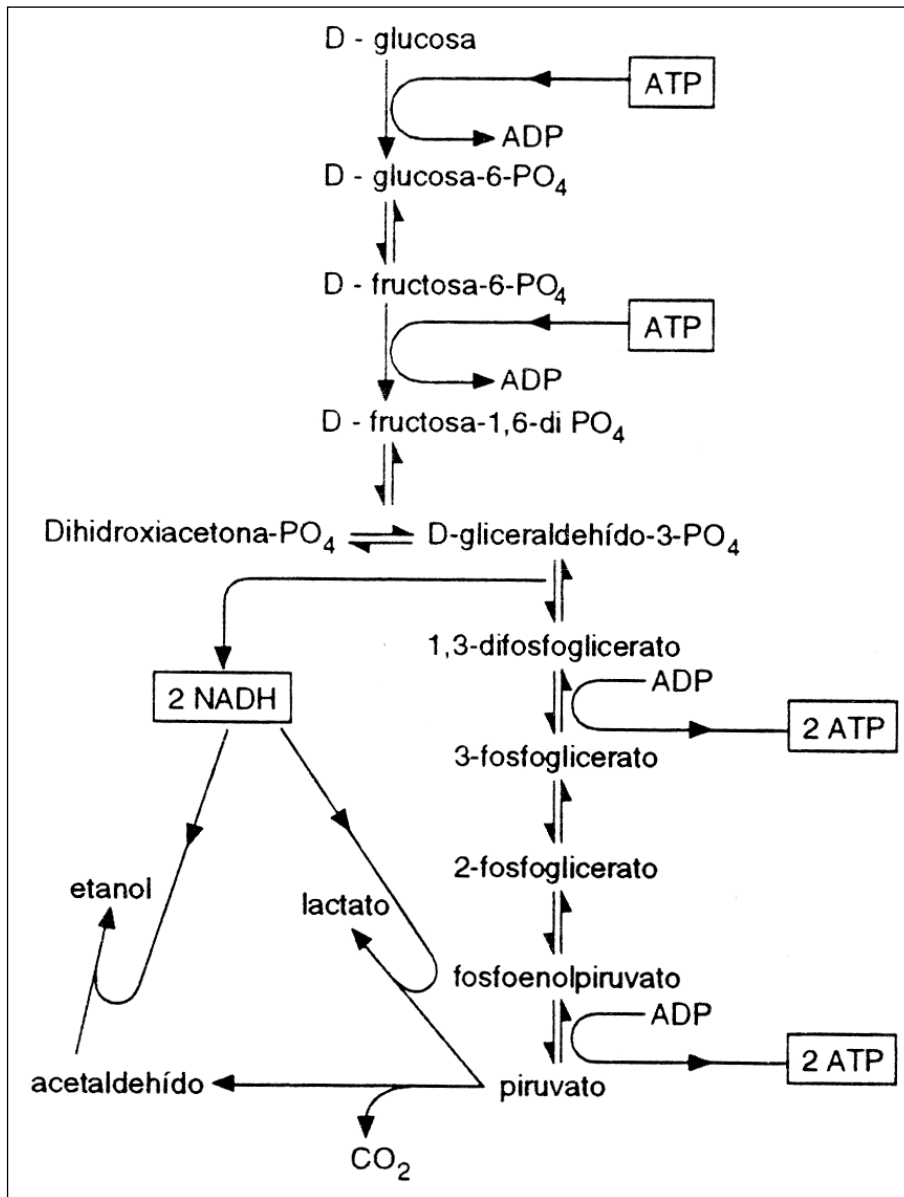


Figura 3. Glucólisis

por lo tanto, dado que cada molécula de glucosa rinde dos de piruvato, 30 moléculas de ATP son sintetizadas por cada molécula de glucosa que entra al ciclo de Krebs (ver figura 3). Esto, sumado a las seis moléculas de la reoxidación del NADH y las dos del vía glucolítica, da un total de 38 moléculas de ATP por molécula de glucosa respirada. Además de sus funciones como mecanismo generador de energía, el ciclo de Krebs sirve como productor de metabolitos claves para la biosíntesis.

La reducción del oxígeno forma radicales libres que son muy tóxicos para la bacteria. Entre los más importantes se encuentra el superóxido. Éste es eliminado por las bacterias aerobias y tolerantes del oxígeno, por la enzima superoxidodismutasa que cataliza la formación de peróxido de hidrógeno, también tóxico. El peróxido de hidrogeno es degradado por enzimas como catalasa y la peroxidasa, a oxígeno molecular y agua. Estas enzimas están ausentes en las bacterias anaerobias estrictas, explicando en parte la susceptibilidad que tienen al oxígeno.

En las bacterias aerobias obligadas, el oxígeno es el aceptor final de electrones. Sin embargo, las bacterias anaerobias facultativas pueden usar, en ausencia de oxígeno, otros compuestos inorgánicos como aceptores finales de electrones, por ejemplo: nitrato, fumarato, sulfato, etc.

REGULACIÓN DEL METABOLISMO

Cada reacción metabólica está regulada no solo con respecto a otras reacciones, sino también con respecto a la concentración de nutrientes en el medio. La regulación se realiza a diferentes niveles: en la actividad enzimática y en la síntesis de las enzimas. En la primera, regulación de la actividad enzimática, se produce: activación de enzimas alostéricas, inhibición por retroalimentación, activación alostérica y cooperatividad. La inducción enzimática y la represión por productos finales, son mecanismos de regulación de la síntesis de enzimas.

En las bacterias anaerobias facultativas la fermentación (como única vía de producción de energía) es bloqueada en presencia de oxígeno, asegurando que el suministro de energía se produzca por respiración, que consume menos glucosa y acumula menos lactato. En este fenómeno denominado efecto Pasteur, la enzima fosfofructoquinasa es activada o inhibida según la relación entre el ATP y el ADP, regulando así el consumo de glucosa. Este es un ejemplo de regulación de la actividad enzimática por una enzima alostérica. El ejemplo clásico de regulación de la síntesis de enzimas lo constituye el operón lactosa. Hay tres enzimas que participan en la utilización de la lactosa (β -galactosidasa, galactósido permeasa y galactósido transacetilasa), las cuales tienen un promotor único. En ausencia de lactosa, la transcripción para estas enzimas está bloqueada por un represor que se une al promotor inhibiendo la acción de la ARNpolimerasa. Cuando se agrega lactosa al medio, ésta se une al represor, bloqueando de este modo su unión al promotor y permitiendo la acción de la ARNpolimerasa y la síntesis de las tres enzimas anteriormente mencionadas.

Crecimiento bacteriano

Puede ser definido como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de la célula. Las condiciones físicas y químicas del medio donde el microorganismo se encuentra afectan marcadamente sus actividades. La comprensión de como influye el ambiente sobre el crecimiento nos ayuda a explicar la distribución de los microorganismos en la naturaleza y hace posible diseñar estrategias que favorezcan el crecimiento o que nos permita controlarlo. Las bacterias como grupo, son extremadamente versátiles y tienen gran capacidad para utilizar una amplia gama de nutrientes que van desde compuestos inorgánicos simples, a compuestos

orgánicos más complejos. Los nutrientes se pueden dividir en dos clases: esenciales, sin los cuales la célula no puede crecer y no esenciales, se usan cuando están presentes pero no son indispensables. Algunos nutrientes son usados solo como precursores de macromoléculas celulares, otros solo como fuente de energía sin ser incorporados directamente al material celular y otros cumplen las dos funciones al mismo tiempo. También se pueden clasificar como macro y micronutrientes según la cantidad requerida.

MACRONUTRIENTES

El carbono es el mayor constituyente de la célula bacteriana, por lo tanto no llama la atención que requiera más carbono que cualquier otro nutriente. Según la forma en que lo usa, existen fundamentalmente dos tipos de bacterias: autótrofas y heterótrofas. Las primeras son capaces de sintetizar todos sus componentes orgánicos a partir de compuestos inorgánicos como el CO_2 . Como ejemplo de este grupo citamos las bacterias del suelo, que carecen de interés médico. En cambio, las heterótrofas usan sustancias orgánicas como fuente de carbono. En este grupo se encuentran todas las bacterias de interés médico.

La glucosa, por ejemplo, es usada como fuente de carbono y de energía. También existen bacterias que pueden usar otras sustancias orgánicas como fuente parcial o exclusiva de carbono. Entre las bacterias más versátiles se encuentran las del género *Pseudomonas*, muchas de las cuales pueden usar más de cien compuestos orgánicos.

Después del carbono, el elemento más abundante en la célula es el nitrógeno que representa entre el 12 y el 15% del peso seco. Es el constituyente principal de las proteínas y los ácidos nucleicos. La mayoría de las bacterias son capaces de usar el amonio como fuente de nitrógeno, mientras que otras pueden usar los nitratos. La reducción de nitratos, se puede lograr por dos mecanismos diferentes: reducción asimiladora, en la cual se reduce por la vía del nitrito y reducción desasimiladora, donde el nitrato sirve como aceptor final de electrones. La primera está bastante extendida entre las bacterias, mientras que la segunda solo es común en bacterias anaerobias y anaerobias facultativas.

El fósforo es usado para la síntesis de ácidos nucleicos y de fosfolípidos. La mayoría de las bacterias lo usan en forma inorgánica como fosfato ($\text{PO}_4=$). Los fosfatos orgánicos si bien están distribuidos ampliamente en la naturaleza, para ser usados deben ser atacados primero por fosfatasa, enzimas que clivan estos compuestos liberando el fósforo inorgánico.

MICRONUTRIENTES

Aunque requeridos en cantidades muy pequeñas, los micronutrientes son importantes para la nutrición de la bacteria. Entre estos destacamos el cobalto, el cobre y el manganeso.

FACTORES DE CRECIMIENTO

Son sustancias que deben ser aportadas preformadas, porque la bacteria que los requieren no pueden sintetizarlos a partir de los nutrientes ya sea por falla o ausencia de una vía metabólica determinada. Estas sustancias incluyen vitaminas del complejo B, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Las bacterias que no necesitan factores de crecimiento, se denominan prototróficas y, las que sí los requieren, auxotróficas para ese factor.

REQUERIMIENTOS ATMOSFÉRICOS Y AMBIENTALES

Oxígeno

Las exigencias de oxígeno de una bacteria en particular, reflejan el tipo de metabolismo pro-

ductor de energía. Según su relación con el oxígeno, existen bacterias: anaerobias obligadas, anaerobias facultativas, aerobias obligadas y microaerófilas.

De las primeras (anaerobias obligadas), existen las estrictas y las aerotolerantes. Las bacterias anaerobias obligadas estrictas, crecen en ausencia de oxígeno, el cual es muy tóxico e incluso letal cuando la exposición es breve. Las segundas (aerotolerantes) también crecen solo en ausencia de oxígeno, pero toleran su presencia un poco más que las anteriores; por ejemplo: *Clostridium* sp. Las bacterias anaerobias facultativas, son capaces de crecer en presencia o en ausencia de oxígeno. Ejemplo de éstas son las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Las aerobias obligadas, requieren oxígeno para su desarrollo. Dentro de este grupo se encuentran la *Pseudomonas*. Por último, las microaerófilas crecen mejor con presiones de oxígeno bajas (3 a 5%); las concentraciones altas (21%) inhiben su crecimiento.

En las bacterias aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias aerotolerantes, la enzima superoxidodismutasa impide la acumulación del radical superóxido; esta enzima está ausente en los anaerobios estrictos. El peróxido de hidrógeno formado por la acción de la superoxidodismutasa es destruido con rapidez por la enzima catalasa o peroxidasa, como ya se mencionó.

En el laboratorio de microbiología los requerimientos atmosféricos de oxígeno, pueden determinarse cultivando la cepa en caldo tioglicolato. Este medio contiene muchos nutrientes, siendo un caldo de enriquecimiento apropiado para casi todas las bacterias de interés médico. El ácido tioglicólico actúa como agente reductor que disminuye el potencial redox del medio, generando un gradiente de concentración de oxígeno a lo largo del tubo. En la superficie del medio, la concentración es similar a la atmosférica y va disminuyendo gradualmente hasta que en el fondo del tubo no existe oxígeno disuelto. Las bacterias aerobias estrictas podrán crecer en la superficie del caldo, las microaerófilas crecerán en la franja inmediata que está debajo de la superficie. Las anaerobias facultativas crecerán en todo el tubo, mientras que las anaerobias lo harán en el fondo del mismo.

Anhídrido carbónico

Algunas bacterias como *Neisseria* y la *Brucella*, tienen muchas enzimas con baja afinidad por el CO_2 y requieren una concentración más elevada (10%) de la que habitualmente está presente en la atmósfera (0.03%).

Estos requerimientos atmosféricos mencionados deben ser tenidos en cuenta cuando se realiza el cultivo de estas bacterias.

Potencial de oxidación reducción

Es un requerimiento físico del medio de cultivo. Éste es un factor crítico para determinar si se desarrollará o no el inóculo sembrado en dicho medio. Para la mayoría de los medios de cultivo en contacto con el aire, el potencial de oxidación reducción es de +0,2 a +0,4V, a pH 7. Las bacterias anaerobias obligadas son incapaces de crecer a menos que el potencial sea tan bajo como -0,2V. Para establecer dichas condiciones en un medio de cultivo se puede eliminar el oxígeno, recurriendo a sistemas de cultivo anaerobio o agregando al propio medio compuestos que contengan sulfidrilos, por ejemplo el tioglicolato de sodio.

Temperatura

Es uno de los factores ambientales más importantes que influyen en la proliferación y mantenimiento de la vitalidad de los microorganismos. Cada bacteria tiene su propia temperatura mínima por debajo de la cual no puede proliferar, temperatura óptima en la cual el crecimiento es más rápido y temperatura máxima por encima de la cual no puede multiplicarse. Así, es

posible distinguir tres grupos de microorganismos según el rango de temperatura en el que es posible su multiplicación: psicrófilas, crecen entre -5 y 30°C , temperatura óptimo de 15°C ; mesófilas, crece entre 10 y 45°C , con el óptimo a los 30°C y termófilas, que crecen entre 25 y 80°C , con el óptimo en 55°C .

En el laboratorio se puede determinar la temperatura óptima de crecimiento, sembrando el microorganismo en estudio en un medio de cultivo adecuado e incubándolo a diferentes temperaturas, para después evaluar los rendimientos obtenidos en las distintas condiciones. Si bien la mayoría de los microorganismos de interés médico son mesófilos, pueden existir diferencias entre las temperaturas de crecimiento óptimas de los mismos, siendo para la mayoría de 35 a 37°C .

Concentraciones de hidrógeno

Cada microorganismo tiene un rango de pH en cual puede crecer y un pH óptimo bien definido. Según en el pH que se obtenga mayor rendimiento, encontramos microorganismos acidófilos, neutrófilos (la mayoría de interés médico) y alcalófilos, que crecen bien en pH ácidos, neutros y alcalinos respectivamente.

Para la mayoría de las bacterias de interés médico, el pH óptimo es de $7,2$ a $7,6$. Sin embargo, hay microorganismos humanos como *M. tuberculosis* que resisten valores muy bajos de pH.

Como los microorganismos al multiplicarse y realizar sus funciones metabólicas, suelen modificar el pH del medio, éste puede prepararse con amortiguadores de pH (buffer), los cuales mantiene el pH relativamente constante.

Condiciones osmóticas y disponibilidad de agua

El agua es un requerimiento esencial para todo ser vivo y la disponibilidad de ésta es un factor importante que afecta el crecimiento de los microorganismos en sus ambientes naturales. Esta disponibilidad no depende solamente del contenido de agua que haya en el ambiente, porque algunas sustancias y superficies pueden absorber moléculas de agua y por consiguiente reducir la disponibilidad en el ambiente. Las sales y los azúcares disueltos en agua, condicionan la disponibilidad de la misma porque las moléculas de agua se asocian y no quedan disponibles para ser usadas por los microorganismos. La disponibilidad de agua se expresa generalmente como actividad acuosa o potencial de agua.

Generalmente los microorganismos se encuentran en ambientes con menor cantidad de solutos que en el interior celular, por lo tanto el agua tiende a entrar a la célula por osmosis. Por el contrario, si se encuentran en medios de baja actividad acuosa, el agua tenderá a salir de la célula, por lo tanto perderá agua. Así, encontramos microorganismos que pueden crecer en altas concentraciones salinas (halófilos) como las que están en el agua de mar, en altas concentraciones de azúcar (osmófilos) como las que hay en una jalea o en ambientes muy secos (xerófilos). Estos generalmente captan agua de dichos ambientes, gracias a las altas concentraciones de solutos en su interior. La concentración de solutos con actividad osmótica dentro de la célula bacteriana es superior a la concentración del exterior celular. Con excepción de las bacterias del género *Mycoplasma* y de las formas lister (L) que no tienen pared celular, la mayoría de las bacterias tienen tolerancia osmótica que les permite soportar grandes cambios de osmolaridad.

Captación de nutrientes

La concentración de solutos en el interior de una célula bacteriana es mayor que en el medio

extracelular. Esto es aplicable tanto al medio natural como a la mayoría de los medios de cultivo usados en el laboratorio. La principal barrera para el paso de solutos entre la célula y el medio externo es la membrana celular. Las bacterias están rodeadas de membranas semi-permeables, compuestas por una mezcla compleja de proteínas, lípidos y glucoproteínas, que restringen el ingreso de la mayoría de los solutos. Sin embargo, tienen sistemas que permiten el transporte de sustancias pequeñas a través de dichas membranas. Las moléculas de mayor tamaño primero deben ser degradadas a moléculas más pequeñas por enzimas (exoenzimas) producidas por la propia bacteria y secretadas al exterior celular. En las bacterias gramnegativas estas exoenzimas se encuentran fundamentalmente en el espacio periplásmico (espacio virtual ubicado entre la membrana externa y la membrana plasmática), mientras que en las bacterias grampositivas están ancladas en la membrana plasmática. Dichas enzimas son activas sobre: proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos, entre otros. Bacterias como *S. aureus*, *S. pyogenes*, y *C. perfringens*, elaboran algunas de estas enzimas que contribuyen a la virulencia, destruyendo los componentes vitales de los tejidos del huésped infectado. Pueden ser constitutivas (se sintetizan siempre) o inducibles (se sintetizan solo cuando está presente su sustrato).

Con excepción del agua y el amonio que ingresan a la célula por difusión pasiva en respuesta a un gradiente de concentración a ambos lados de la membrana, el resto de los metabolitos lo hacen por sistemas de transporte más específicos.

Tanto las porinas, como los canales de maltosa, no requieren consumo de energía. Los primeros son sistemas inespecíficos que permiten el ingreso de moléculas pequeñas (peso molecular menor o igual a seis mil dalton). Las porinas son proteínas ubicadas en la membrana externa de las bacterias gramnegativas, que forman canales o poros permitiendo el pasaje de las moléculas pequeñas e hidrofílicas.

En la difusión facilitada, una proteína asociada a la membrana celular facilita el equilibrio a ambos lados de la misma, actuando en conjunto con una quinasa citoplasmática dependiente de ATP. Estas proteínas de membrana se denominan permeasas y muchas son inducidas por el sustrato a ser transportado. Cuando la sustancia es fosforilada por la quinasa citoplasmática, queda atrapada dentro de la célula. La difusión facilitada se parece a la difusión simple, porque el sustrato se mueve por un gradiente de concentración (de mayor a menor), por lo tanto el propio proceso de transporte no requiere energía. La diferencia que tiene con la difusión pasiva, es que está mediada por una proteína transportadora, es más rápida y tiene mayor especificidad de sustrato.

El transporte activo permite que los solutos ingresen a la célula en contra de un gradiente de concentración, consumiendo energía metabólica.

Como ejemplo citaremos al sistema de la β -galactósido permeasa, mediante el cual la lactosa (disacárido) es concentrado dentro de una bacteria como *E. coli*. El transporte de la lactosa se produce por una permeasa específica (proteína M); dicha reacción implica gasto de energía. La energía se usa para disminuir la afinidad de la permeasa por la lactosa en la parte interna de la membrana celular, favoreciendo su rápida liberación dentro del citoplasma. Si la generación de energía es bloqueada por el agregado de azida de sodio al sistema, la permeasa cataliza la difusión facilitada de la lactosa, cesando el transporte cuando la concentración del disacárido sea la misma a ambos lados de la membrana.

En medios aerobios y a pH neutro, la baja concentración de hierro no permite alcanzar un desarrollo óptimo. Las bacterias han desarrollado varios sistemas para obtener cantidades adecuadas de dicho elemento. Los sideróforos son ligandos de bajo peso molecular cuya función es suministrar hierro a la célula. Aunque existe una variación importante en la estructura de

los distintos tipos de sideróforos conocidos, la mayoría son de dos tipos: catecoles: la enterobactina es la más estudiada; e hidroximatos: producidos por algunos hongos. La enterobactina es un poderoso quelante que *E. coli* produce rápidamente cuando existe déficit de hierro y la secreta al medio externo.

Crecimiento de las poblaciones bacterianas

El paso esencial para iniciar el estudio de una cepa bacteriana, es el cultivo. Este paso es importante para proveer de una población de bacterias que puedan ser analizadas mediante pruebas bioquímicas, serológicas, genéticas y de susceptibilidad a los antibióticos. El cultivo es el proceso de propagación de los microorganismos en el laboratorio, que se obtiene aportando las condiciones ambientales adecuadas y los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. Debemos recordar que algunas de las bacterias que causan infecciones en seres humanos no son capaces de crecer en medios artificiales inertes.

Es necesario conocer cuales son los requisitos básicos de la bacteria en cuestión para su cultivo en el laboratorio (nutrientes, requerimientos atmosféricos y ambientales), así como los requisitos del o de los tipos bacterianos que se necesite recuperar.

La siembra de un material que contiene bacterias en un medio sólido adecuado con la técnica de aislamiento permite, luego de un período adecuado de incubación, la recuperación de millones de bacterias agrupadas en colonias aisladas. Éstas pueden ser aisladas nuevamente en un nuevo medio para obtener un cultivo puro.

El crecimiento se define como el aumento del número de bacterias en una población determinada (ver figura 4). Es importante diferenciar entre el crecimiento de una célula individual y el de una población. Dicho crecimiento celular es el resultado del aumento del tamaño de la célula, seguido de su división. El crecimiento de una población, en cambio, es el resultado del aumento del número total de células, que puede ser cuantificado directamente (contando el número de células) o indirectamente (por ejemplo, midiendo la masa celular). El recuento de células totales puede determinarse por recuento microscópico en una cámara con áreas de volumen conocido, contando las células por unidades. Este recuento, considera la totalidad de las células presentes en la muestra (viables y no viables). Para realizar un recuento de las células viables, es necesario hacer un cultivo en medio sólido para contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en un volumen conocido de la

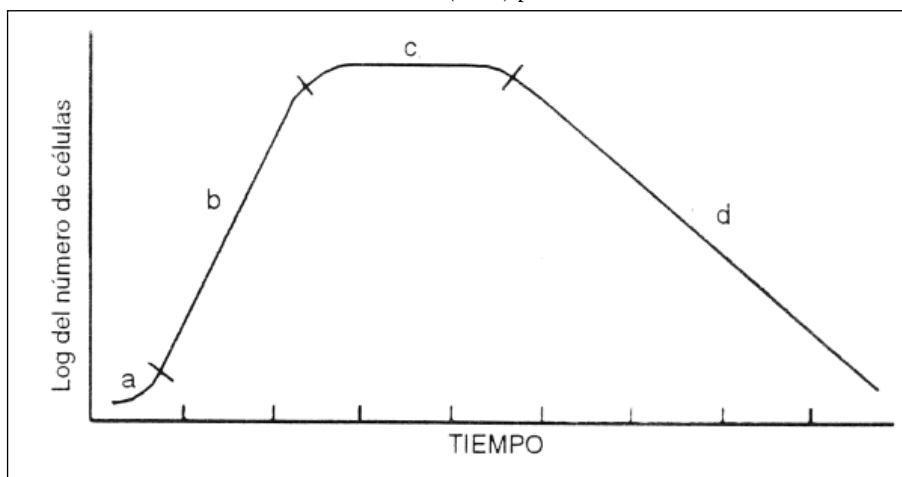


Figura 4. Curva de crecimiento bacteriano

muestra. Dicha técnica puede realizarse por siembra en la superficie de un medio apropiado o por siembra incorporada en agar.

El crecimiento de las poblaciones bacterianas en un sistema de cultivo cerrado (sin entrada ni salida de los componentes del sistema), está limitado por el agotamiento de los nutrientes o bien por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Cuando las bacterias se siembran en el laboratorio en un medio líquido (por ejemplo en un tubo de ensayo), se trata de un sistema cerrado de cultivo. Si se toman muestras a intervalos regulares en diferentes tiempos de incubación y se realiza un recuento del número de células viables por mililitro de cultivo, la representación gráfica de los datos (conteo de células viables en función del tiempo) dará la curva de crecimiento característica que consta de cuatro fases: latencia, exponencial, estacionaria y muerte.

FASE DE LATENCIA

Las bacterias transferidas de un cultivo en fase estacionaria a un medio fresco, sufren un cambio en su composición química antes de ser capaces de iniciar la multiplicación. Hay aumento de los componentes macromoleculares y de la actividad metabólica, casi sin división celular, asociado a un incremento de la susceptibilidad a los agentes físicos y químicos. Por lo tanto, la mal llamada fase de latencia implica intensa actividad metabólica.

FASE EXPONENCIAL

Las células se dividen a velocidad constante, determinada por la naturaleza intrínseca de la bacteria y por las condiciones del medio. Existe gran aumento del número total de células viables, que puede ser expresado en forma exponencial. Próximo al final de esta fase, se produce la liberación de exotoxinas por las bacterias que las producen.

FASE ESTACIONARIA

Eventualmente el agotamiento de los nutrientes o la acumulación de productos tóxicos determina el cese del crecimiento. Hay pérdida de células por muerte, la cual es balanceada por la formación de nuevas células. Cuando esto ocurre, el conteo total de células aumenta levemente aunque el de las bacterias viables permanece constante. Hacia el final de esta etapa, puede ocurrir la esporulación en aquellas bacterias que poseen este mecanismo de resistencia.

FASE DE MUERTE

Luego de la fase estacionaria, la tasa de muerte se incrementa, el número de bacterias viables disminuye rápidamente y, por lo tanto la curva de crecimiento declina.

Las características de la curva de crecimiento pueden variar, dependiendo de las características propias del microorganismo, del estado metabólico del inóculo, del medio de cultivo y de las condiciones de incubación. Las condiciones físicas y químicas del medio donde el microorganismo crece afectan las actividades de éstos. La comprensión de cómo influye el ambiente en el crecimiento, nos ayuda a explicar la distribución de los microorganismos en la naturaleza y hace posible diseñar métodos que permitan estudiar y controlar el crecimiento bacteriano.

Además, existen sistemas de cultivo abiertos que son poco usados en el laboratorio de microbiología clínica. El cultivo continuo (con aporte y salida de nutrientes y requerimientos a una tasa constante), permite mantener a las bacterias en una misma fase de crecimiento

durante un largo período de tiempo (por ejemplo en la fase estacionaria o en la exponencial). Dicha técnica es interesante por ejemplo para los procesos productivos.

Medios de cultivo

Son una mezcla equilibrada de nutrientes requeridos a concentraciones que permiten el crecimiento de los microorganismos. Deben contener todos los nutrientes necesarios en cantidades apropiadas a los requerimientos de los microorganismos y en condiciones de pH, presión osmótica, oxígeno disuelto, etc., adecuados para el crecimiento. Aunque los diferentes microorganismos tienen distintas propiedades fisiológicas y requerimientos nutricionales, la composición química de las células es constante en todo el mundo vivo.

Los medios más simples están compuestos por una base mineral se puede suplementar con una fuente de carbono, de energía, de nitrógeno y con algún factor de crecimiento requerido. Los medios deben esterilizarse antes de ser usados. Esta esterilización generalmente se realiza con calor húmedo, pero algunos medios con componentes sensibles al calor pueden filtrarse.

Existen muchos medios con diferentes utilidades que pueden ser clasificados de la siguiente manera. Según su consistencia en: líquidos, semisólidos y sólidos. Los medios sólidos son usados para el aislamiento bacteriano, mientras que los líquidos son útiles para el enriquecimiento de una población bacteriana de interés. Según su composición: definidos (de composición química conocida, medios simples) y complejos (con agregados de sustancias no definidas, por ejemplo extracto de levadura). Según la cantidad de nutrientes: pobres (por ejemplo el agar simple) y ricos (por ejemplo el agar sangre). También pueden clasificarse en medios: diferenciales, que permiten diferenciar algunas propiedades distintivas del grupo bacteriano (por ejemplo el uso de lactosa en agar CLED); y selectivos, que permiten el desarrollo de algunos microorganismos pero no de otros (por ejemplo el Mac Conckey para la selección de bacterias gramnegativas). También existen los medios especiales para el transporte de muestras o cepas, o aquellos específicos para identificar alguna vía metabólica determinada.

Bibliografía

- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. editores. Bailey & Scott 's. Diagnostic Microbiology. 11th. ed. St. Louis, Missouri. Mosby. 2002.
- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilgert CM. editores, Zinsser Microbiología. 20ª ed. BsAs. Panamericana; 1994.

