

FISIOLOGIA Y METABOLISMO BACTERIANO

Gustavo Varela

Las bacterias son seres vivos y están compuestas al igual que las células eucariotas por proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos, entre otros. Estas moléculas a su vez forman parte de estructuras celulares más complejas, como por ejemplo la pared celular y la membrana citoplasmática. Una característica de los seres vivos es la capacidad para sintetizar sus propios constituyentes a partir de nutrientes que toman del medio externo. El crecimiento bacteriano se define como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de la célula. Se trata de un proceso complejo, que supone la replicación de todas las estructuras y componentes celulares a partir de los nutrientes exógenos.

El conocimiento de la fisiología y del metabolismo bacteriano tiene algunas aplicaciones prácticas:

- Permite conocer el modo de vida y el hábitat de diferentes especies bacterianas. El ser humano actuando como hospedero por ejemplo, ofrece una variedad de nichos ecológicos que se diferencian entre sí por aspectos físicos y químicos (temperatura, concentración de O₂, pH, presión osmótica, etc.) en los cuales pueden crecer y multiplicarse distintas especies bacterianas, de acuerdo a sus requerimientos nutricionales.

- Permite formular medios de cultivo para el aislamiento e identificación de los patógenos participantes.

- Desde el punto de vista terapéutico nos permite conocer y entender el modo de acción de algunos antimicrobianos 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 tiene lugar en la célula, y tiene 3 funciones específicas a saber:

- obtener energía química del entorno, almacenarla, para utilizar luego en diferentes funciones celulares,

- convertir los nutrientes exógenos en unidades precursoras de los componentes macromoleculares de la célula bacteriana,

- formar y degradar moléculas necesarias para funciones celulares específicas, como por ejemplo, movilidad y captación de nutrientes.

El **metabolismo** tiene lugar a través de 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 como 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**.

Vimos de este modo los 2 tipos de transformaciones químicas que ocurren simultáneamente en la bacteria, y así el **metabolismo** es el resultado colectivo de ambas reacciones. Las reacciones 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 **óxido-reducción** del catabolismo debe ser almacenada y transportada de algún modo. Una forma es como compuestos con uniones fosfato de alta energía, y son estos los que luego sirven 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 adenosintrifosfato (**ATP**). Este se genera en la célula bacteriana por 2 procesos diferentes, llamados: **fosforilación a nivel del sustrato** y **fosforilación oxidativa**.

METABOLISMO PRODUCTOR DE ENERGIA

En los seres vivos, la utilización de la energía potencial contenida en los nutrientes se produce por reacciones de **óxido-reducción**. Químicamente la oxidación está definida por la pérdida de electrones (e⁻) y la reducción por la ganancia de los mismos. En bioquímica, las reacciones de **óxido-reducción** frecuentemente incluyen no sólo la transferencia de e⁻ sino de átomos enteros de hidrógeno, por lo que se conocen también con el nombre de reacciones de deshidrogenación. En reacciones de este tipo hay sustancias que ceden e⁻ (dadoras) y otras que los aceptan (aceptoras). En las bacterias de interés médico los sistemas de oxido-reducción que transforman la energía química de los nutrientes en una forma biológicamente útil, incluyen la **fermentación** y la **respiración**. En la **fermentación** tanto la molécula dadora como la aceptora de electrones, son compuestos orgánicos, mientras que en la respiración hay un aceptor final exógeno, que cuando es el oxígeno hablamos de **respiración aerobia**, y cuando es un compuesto inorgánico hablamos de **respiración anaerobia**.

FERMENTACION: En la fermentación, los e⁻ pasan del dador, un intermediario formado durante la degradación de la molécula de sustrato, hacia un aceptor constituido por algún otro intermediario orgánico, también generado durante el catabolismo del sustrato inicial. Por lo tanto, este proceso de oxido-reducción no requiere el aporte exógeno de un aceptor final de electrones.

Hay distintos tipos de fermentaciones, pero todas llevan a una oxidación parcial de los átomos de carbono del sustrato inicial y liberan por lo tanto sólo una pequeña parte de la energía potencial contenida. El rendimiento

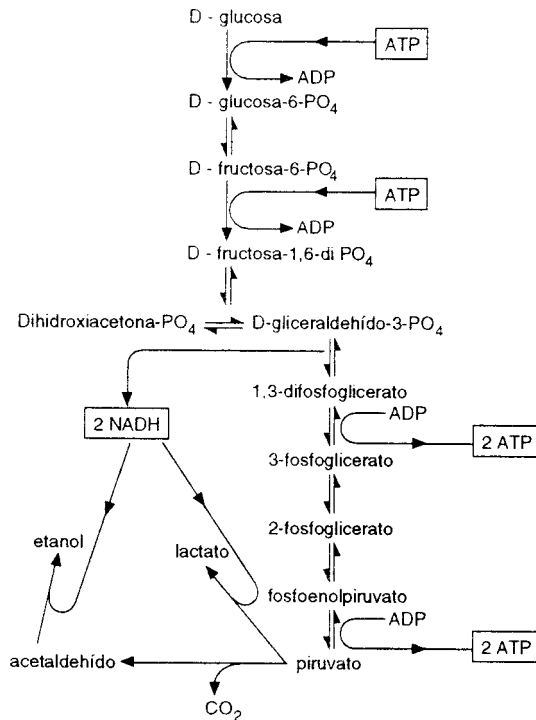


Fig. 1 - Esquema de la vía glucolítica o de EMP.

energético de este proceso es menor que el de la **respiración**. En las bacterias se encuentran las 3 vías centrales del metabolismo intermediario de los hidratos de carbono:

- la vía **glucolítica** o de **Embden Meyerhof Parnas**
- la vía de **pentosa fosfato** o **shunt de las pentosas**
- la vía de **Entner-Doudoroff**.

La vía glucolítica para la degradación de la glucosa se divide en 3 etapas principales. La etapa 1 es preparativa, con reacciones que no son de oxido-reducción, sin liberación de energía, y con formación de 2 intermediarios de 3 átomos de carbono cada uno. En la etapa 2 ocurren reacciones de oxido-reducción, con liberación de energía, formación de **ATP** por el proceso de **fosforilación a nivel del sustrato** (el **ATP** es generado durante un paso enzimático específico), y se forman 2 moléculas de piruvato. En la etapa 3 nuevamente ocurren reacciones de oxido-reducción y se generan los productos finales de la fermentación, que varían según la bacteria en cuestión. Sólo una pequeña parte del total de la energía libre que potencialmente puede derivar de la degradación de una molécula de glucosa queda disponible por esta vía, debido a que los productos finales son compuestos en los que el carbono se encuentra todavía en estado reducido.

Por cada molécula de glucosa que entra a esta vía, se forman 4 moléculas de **ATP**, y como se consumen 2 en la etapa 1, el balance neto es de 2 moléculas de **ATP** por molécula de glucosa fermentada. El destino final del metabolito clave, el **piruvato**, depende de los procesos empleados para la regeneración de **NAD** a partir del **NADH** y así mantener el equilibrio de oxido-reducción.

Vía de la **pentosa fosfato**. Mientras que la vía glucolítica es la más importante en células eucariotas y procariontas, no es la única. El **shunt 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 utilizan esta vía como fuente de **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 bacterias aerobias estrictas como *Neisseria* y *Pseudomonas*. Como sucede en la vía de las pentosas, aquí sólo se produce una molécula de **ATP** por molécula de glucosa degradada.

Destino final del piruvato.

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 reoxidarse nuevamente a **NAD** para alcanzar el equilibrio final de oxido-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, acumulándose gran cantidad de metabolitos finales de la fermentación. El estudio y conocimiento de las fermentaciones bacterianas tiene importancia práctica, ya que, proporcionan productos de valor industrial, y son de utilidad en el laboratorio para la identificación de diferentes especies. Entonces, de acuerdo a los productos finales de la **fermentación**, tenemos:

- Fermentación alcohólica: el tipo de fermentación más

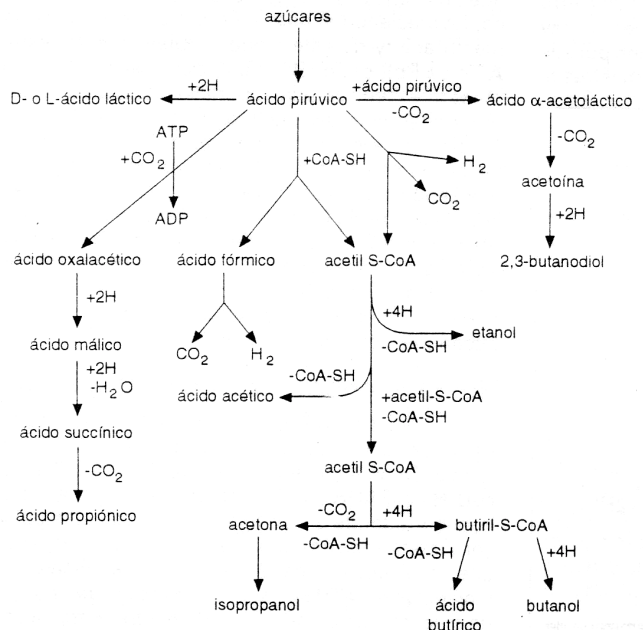


Fig. 2 - Destino del ácido pirúvico

antigua que se conoce es la producción de etanol a partir de la 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. El piruvato en este caso se reduce a ácido láctico por acción de la enzima láctico deshidrogenasa, actuando el **NADH** como dador de e-. Esto ocurre en la etapa 3 de la vía glucolítica.

- Fermentación heteroláctica: En este tipo de fermentación sólo la mitad de la glucosa se convierte en ácido láctico, el resto en una mezcla de CO₂, ácido fórmico, ácido acético, etc. En esta fermentación se emplea fundamentalmente el **shunt de las pentosas**, y se da en bacterias del género *Leuconostoc* y *Lactobacillus*.

- Fermentación del ácido propiónico: es característica en algunas bacterias **anaerobias** como *Propionibacterium* (bacilo Gram+ 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, succínico y 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 2 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 Gram+, anaerobio, esporulado).

Si bien hasta ahora nos hemos referido sólo a la fermentación de hidratos de carbono como procedimiento para obtener energía por parte de las bacterias, debemos destacar que otros compuestos orgánicos pueden ser fermentados como, por ejemplo, aminoácidos (ala-nina, glicina). En el caso de los *Clostridium* proteolíticos la fermentación de aminoácidos más característica es la reacción de Stickland.

Hemos discutido más arriba el metabolismo de los hidratos de carbono en ausencia de un aceptor externo de electrones y vimos que sólo una pequeña parte de la energía potencial contenida en el sustrato es liberada. Esto se debe fundamentalmente a que la diferencia entre los potenciales de óxido-reducción entre la molécula dadora inicial y la molécula aceptora final es muy pequeña. Otras bacterias tienen la capacidad de oxidar completamente el sustrato inicial a CO₂, por el proceso conocido como **respiración**.

RESPIRACION AEROBIA

Es el proceso por el cual un sustrato es oxidado completamente a CO₂ y H₂O, con participación de una cadena de e- (ubicada en la membrana citoplasmática) y el aceptor final es el oxígeno molecular. 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, propiónico, etc.) en la respiración es oxidado completamente a CO₂ a través del **ciclo de Krebs**. Por cada molécula de **piruvato** oxidada a través del ciclo se generan 3 moléculas de CO₂. Al igual que en la **fermentación**, los e- generados en el ciclo de **Krebs**, pasan a coenzimas que tienen **NAD**. Sin embargo, en la **respiración**, los e- 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 GENERACION DE ATP.

Estos sistemas están compuestos de "carriers" de e- asociados a la membrana citoplasmática y tienen 2 funciones básicas,

1. aceptar e- de un donador y cederlos a un aceptor, y
2. conservar algo de la energía liberada durante ese transporte en forma de **ATP** por el proceso

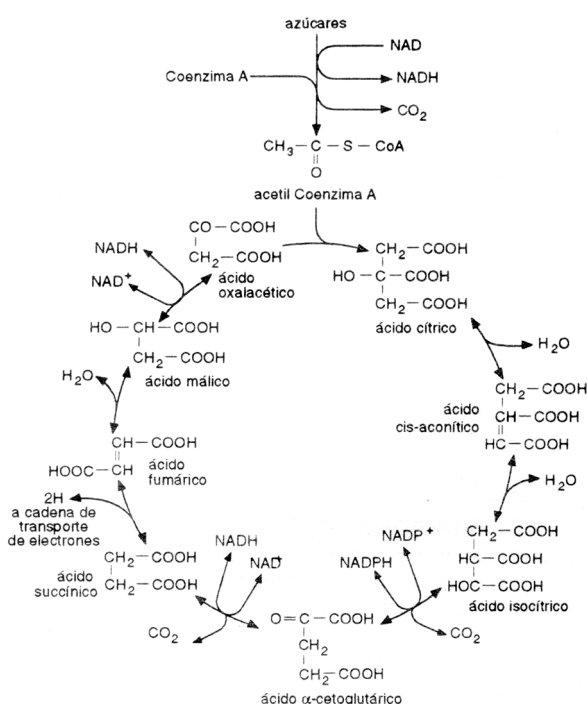


Fig. 3 - Ciclo de los ácidos tricarboxílicos o Ciclo de Krebs

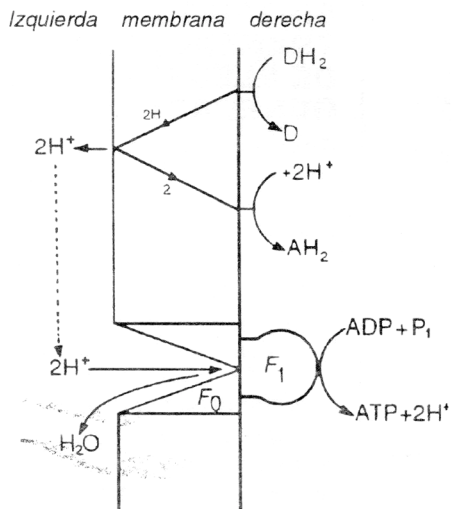


Fig. 4 - Modelo propuesto para el estado energizado de la membrana

conocido como **fosforilación oxidativa**.

Existen varios tipos de enzimas de óxido-reducción y proteínas transportadoras de e-, 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 oxida alternativamente. La riboflavina, conocida como vitamina B2, es requerida como **factor de crecimiento** por algunas bacterias. Los **citocromos** son proteínas que tienen anillos porfirínicos con hierro y también se oxidan y reducen alternativamente. Hay diferentes tipos de **citocromos** y 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 e-.

Para entender la manera por la cual se genera **ATP** durante el transporte de electrones debemos recordar su orientación con respecto a la membrana citoplasmática de la célula bacteriana. La cadena está ubicada como ya dijimos en la membrana citoplasmática, 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 e- dentro, como consecuencia de esto se genera a través de la membrana citoplasmática un gradiente de pH y un potencial eléctrico, estando el lado externo ácido y cargado positivamente y, el interior alcalino y cargado negativamente. A pesar de su pequeño tamaño ni los H+ ni los OH- atraviesan libremente la membrana, por lo tanto, el equilibrio no puede establecerse espontáneamente. Este "estado energizado de la membrana", similar a una batería puede ser usado por la célula para realizar un trabajo útil, por ejemplo, motilidad o síntesis de **ATP**. Para la síntesis de **ATP** un componente fundamental del proceso es una **ATPasa** de

membrana; esta enzima cataliza la reacción reversible entre **ADP** y **ATP**. Operando en una dirección y utilizando el gradiente de protones generado durante el transporte, cataliza la formación de **ATP** a partir de **ADP** más **Pi**. Existe una variedad de agentes químicos llamados **desacopladores** que inhiben la síntesis de **ATP** durante el transporte de e- sin afectar 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 eléctrico, favoreciendo el pasaje de protones a través de la membrana, y de este modo inhibiendo la síntesis de **ATP**. La **Polimixina B** (un antimicrobiano) se adosa de manera específica a la superficie externa de la membrana, alterando su estructura y propiedades osmóticas. Se produce entonces una pérdida de metabolitos y la inhibición de cierto número de procesos bioquímicos que tienen lugar a ese nivel, como el transporte de e- 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 tanto sobre células eucariotas como procariontas.

BALANCE ENERGETICO DE LA RESPIRACION

El resultado neto de las reacciones del **ciclo de Krebs** es la oxidación completa del **piruvato** a CO_2 con formación de 4 moléculas de **NADH** y 1 de **FADH**. El **NADH** y el **FADH** pueden ser reoxidados por el sistema transportador de e-. Un total de 15 moléculas de **ATP** son sintetizadas en cada vuelta del ciclo, por lo tanto, ya que la glucosa rinde 2 moléculas de **piruvato**, 30 moléculas de **ATP** son sintetizadas por cada molécula de glucosa que entra al ciclo de **Krebs**. Esto, sumado a las 6 moléculas de la reoxidación del **NADH** y las 2 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 da lugar a la formación de radicales libres que son muy tóxicos para la bacteria. Entre los más importantes se encuentra el radical **superóxido**.

Este es eliminado en las bacterias aerobias y aerotolerantes por la enzima **superoxidodismutasa** que cataliza la formación de **peróxido de hidrógeno**, compuesto también tóxico que es degradado a su vez por enzimas como **catalasa** y **peroxidasa** a oxígeno molecular y H_2O . Estas enzimas están ausentes en las bacterias **anaerobias estrictas**, explicando en parte la susceptibilidad de estas al oxígeno.

RESPIRACION ANAEROBIA: En las bacterias

aerobias obligadas el O₂ es el aceptor final de e⁻. Sin embargo, las bacterias anaerobias facultativas pueden utilizar, en ausencia de O₂, una variedad de compuestos inorgánicos como aceptores finales de e⁻ por ejemplo, nitrato, fumarato, sulfato, etc.

REGULACION DEL METABOLISMO: Cada reacción metabólica está regulada no sólo con respecto a otras reacciones sino también con respecto a la concentración de nutrientes en el medio. La regulación se realiza a diferentes niveles:

-Regulación de la actividad enzimática a través de: enzimas alostéricas, inhibición por retroalimentación, activación alostérica, y cooperatividad.

-Regulación de la síntesis de enzimas por: inducción enzimática y represión por productos finales.

En las bacterias **anaerobias facultativas** la fermentación (como única vía de generación de energía) es bloqueada en presencia de oxígeno, asegurando que el suministro de energía se produzca por la respiración, que consume menos glucosa y acumula menos lactato. En este fenómeno, conocido como **efecto Pasteur**, la enzima fosfofructoquinasa es activada o inhibida según la relación ATP/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 a nivel de la síntesis de enzimas lo constituye el **operón lactosa**. Hay 3 enzimas que participan en la utilización de la lactosa (β -galactosidasa, galactósido permeasa y galactósido transacetilasa) que tienen un promotor único. En ausencia de lactosa, la transcripción para estas enzimas está bloqueada por acción de un represor que se une al promotor inhibiendo la acción de la **ARN polimerasa**. Cuando se agrega lactosa al medio, ésta se une al represor, bloqueando de este modo su unión al promotor, permitiendo así la acción de la **ARN polimerasa** y la síntesis de las 3 enzimas.

CRECIMIENTO BACTERIANO

Como ya vimos más arriba puede ser definido como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de la célula. Las bacterias como grupo son extremadamente versátiles y tienen una capacidad enorme para utilizar una amplia gama de nutrientes que va desde compuestos inorgánicos simples a compuestos orgánicos más complejos. Los nutrientes se pueden dividir en 2 clases: **esenciales**, sin los cuales la célula no puede crecer, y **no esenciales** que se utilizan cuando están presentes pero no son indispensables. Algunos nutrientes son utilizados sólo como precursores de macromoléculas celulares y otros sólo como fuente de energía sin ser incorporados directamente al material celular, mientras que otros cumplen las 2 funciones a la

vez. 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. De acuerdo a la forma en que lo utilizan tenemos fundamentalmente 2 tipos de bacterias:

-**Autótrofas:** Son capaces de sintetizar casi todos sus componentes orgánicos a partir de compuestos inorgánicos como el CO₂.

-**Heterótrofas:** Utilizan sustancias orgánicas como fuente de carbono. En este último grupo se encuentran todas las bacterias de interés médico.

La glucosa, por ejemplo, es utilizada como fuente de carbono y fuente de energía. También existen bacterias que pueden usar una variedad de otras sustancias orgánicas como fuente parcial o exclusiva de carbono. Entre las bacterias más versátiles se encuentra las del género **Pseudomonas**, muchas de las cuales pueden utilizar más de 100 compuestos orgánicos. Después del **carbono** el elemento más abundante en la célula es el **nitrógeno**, representa entre el 12 y el 15% del peso seco, y es el constituyente principal de proteínas y ácidos nucleicos. La mayoría de las bacterias son capaces de utilizar el amonio como fuente de nitrógeno, mientras que otras pueden usar los nitratos. La reducción de nitratos, se puede lograr por 2 mecanismos diferentes:

1. Reducción asimiladora: En la cual es reducido por la vía del nitrito, y
2. Reducción desasimiladora: Donde el **nitrato** sirve como aceptor final de electrones.

La primera está bastante extendida entre las bacterias mientras que la segunda sólo es común en bacterias **anaerobias** y **anaerobias facultativas**. El **fósforo** es utilizado para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos. La mayoría de las bacterias lo usan en forma inorgánica como PO₄⁼. Los fosfatos orgánicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, pero para ser utilizados deben ser atacados primero por **fosfatasas**, enzimas que clivan estos compuestos liberando fósforo inorgánico.

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

Factores de crecimiento: Son sustancias que deben ser aportadas preformadas, ya que la bacteria que las requiere no las puede sintetizar a partir de los nutrientes más simples, por falla o ausencia de una vía metabólica. Estas sustancias incluyen vitaminas del complejo B, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Las bacterias que no requieren **factores de crecimiento** de denominan prototróficas y las que los requieren, auxotróficas para

ese factor.

Oxígeno: Las exigencias de oxígeno de una bacteria en particular reflejan en parte el tipo de metabolismo productor de energía. De acuerdo a su relación con el oxígeno tenemos:

- **Anaerobios obligados:** Hay de 2 tipos, **estrictos** y **aerotolerantes**, los primeros crecen en ausencia de O₂ y este es sumamente tóxico, incluso letal cuando la exposición es breve. Los segundos también crecen sólo en ausencia de O₂ pero toleran más que los anteriores su presencia;
- **Anaerobios facultativos:** Son capaces de crecer en presencia o ausencia de oxígeno.
- **Aerobios obligados:** Requieren oxígeno para su desarrollo.
- **Microaerófilos:** Crecen mejor con tensiones de oxígeno bajas (3%-5%), las concentraciones elevadas (21%) tienen un efecto inhibitorio para estas bacterias.

En los aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios 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 por **peroxidasas**, como vimos más arriba.

Dióxido de carbono: Algunas bacterias como *Neisseria* y *Brucella* tienen varias enzimas con baja afinidad por el CO₂ y requieren una concentración más elevada (10%) de la que habitualmente está presente en la atmósfera (0.03%).

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

Requerimientos físicos.

POTENCIAL DE OXIDOREDUCCION: El potencial de óxido-reducción de un medio de cultivo es un factor crítico para determinar si se producirá o no el desarrollo de un inóculo sembrado en dicho medio. Para la mayor parte de los medios de cultivo en contacto con el aire, el potencial de óxido-reducción es de +0,2 a +0,4V a Ph 7. Los anaerobios obligados son incapaces de crecer a menos que el potencial sea tan bajo como -0,2V como mínimo. Para establecer estas 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 como por ejemplo el tioglicolato de sodio.

TEMPERATURA: Para cada bacteria existe una temperatura óptima de desarrollo y un rango en el cual este puede ocurrir. Las bacterias se dividen en tres grupos de acuerdo al rango de temperatura en el que

pueden desarrollarse:

- Psicrófilas: -5 a 30 °C, óptimo:15°C
- Mesófilas: 10 a 45°C, óptimo:30°C
- Termófilas: 25 a 80°C, óptimo:55°C.

CONCENTRACION DE HIDROGENO (pH): También aquí existe un valor de pH óptimo dentro de un rango más amplio en el cual el crecimiento puede ocurrir. Para la mayor parte de las bacterias de interés médico, el pH óptimo es de 7,2 a 7,6. Sin embargo hay patógenos humanos como *M.tuberculosis* que resisten valores muy bajos de Ph.

CONDICIONES OSMOTICAS: La concentración de solutos con actividad osmótica dentro de la célula bacteriana es superior a la concentración exterior. Con excepción de los Mycoplasmas y las formas lister (L), que no tienen pared celular, la mayor parte de las bacterias tienen una tolerancia osmótica importante lo que les permite soportar grandes cambios de la 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 utilizados 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 semipermeables, 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 han evolucionado para el transporte de sustancias pequeñas a través de dichas membranas. Las moléculas mayores deben primero ser degradadas a moléculas más pequeñas por enzimas secretadas al exterior por la propia bacteria (**exoenzimas**). En el caso de las bacterias Gram negativas estas exoenzimas se encuentran localizadas fundamentalmente en el espacio periplásmico (espacio virtual ubicado entre la membrana externa y la membrana citoplasmática), mientras en las bacterias Gram positivas están ancladas en la membrana citoplasmática. Estas enzimas son activas sobre: proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos entre otros. Bacterias como *S.aureus*, *S.pyogenes*, y *C.perfringens*, elaboran una variedad de estas enzimas que contribuyen a la patogenia de las enfermedades por ellas producidas, destruyendo componentes vitales de los tejidos del hospedero infectado. Estas enzimas pueden ser constitutivas (se sintetizan siempre) o inducibles (se sintetizan sólo 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, los demás metabolitos lo hacen por sistemas de transporte más

específicos.

Porinas y canales de maltosa: Estos sistemas de transporte no requieren consumo de energía. Los canales de porinas son sistemas **inespecíficos** y permiten el ingreso de moléculas pequeñas de peso molecular menor o igual a 6.000 Da. Las porinas son proteínas ubicadas en la membrana externa de las bacterias Gram negativas que forman canales o poros permitiendo el pasaje de estas moléculas pequeñas e hidrofílicas.

Difusión facilitada: En este caso, una proteína asociada a la membrana facilita el rápido equilibrio a ambos lados de la misma, funcionando en conjunto con una quinasa citoplasmática ATP dependiente. Estas proteínas de membrana se denominan colectivamente **permeasas**, muchas de las cuales son inducidas por el sustrato a ser transportado. Una vez fosforilada la sustancia por la quinasa citoplasmática queda atrapada dentro de la célula. La difusión facilitada se parece a la difusión simple en el sentido de que el sustrato se mueve por un gradiente de concentración, desde la concentración superior a la inferior, por lo tanto el propio proceso de transporte no requiere energía. Difiere de la difusión pasiva en que está mediada por una proteína transportadora, es mucho más rápida y muestra una considerable especificidad de sustrato.

Transporte activo: Este sistema permite que los solutos ingresen a la célula contra un gradiente de concentración gracias al consumo de energía metabólica.

Como ejemplo veremos el **sistema de la β -galactósido permeasa** por el cual el disacárido lactosa es concentrado dentro de una bacteria como **E.coli**. El transporte de la lactosa está mediado por una permeasa específica (conocida como proteína **M**) y esta reacción está acoplada al gasto de energía. La energía se utiliza para disminuir la afinidad de la permeasa por la lactosa en la parte interna de la membrana, favoreciendo de este modo su liberación rápida dentro del citoplasma. Si la generación de energía es bloqueada por el agregado de **azida de sodio** al sistema, la permeasa cataliza simplemente una difusión facilitada de la lactosa, cesando el transporte cuando la concentración del disacárido es la misma a ambos lados de la membrana.

Captación y transporte de hierro: En medios aerobios y a pH neutro la concentración de hierro soluble es baja como para alcanzar un desarrollo óptimo. Las bacterias han desarrollado varios sistemas para obtener cantidades adecuadas de este elemento.

Sideróforos: Son ligandos de peso molecular bajo cuya función es la de suministrar hierro a la célula. Si bien existe una variación importante en la estructura de los

distintos tipos de sideróforos conocidos, casi todos son de dos tipos: catecoles, de los cuales la enterobactina es la más estudiada, e hidroximatos, los cuales son producidos por ciertos hongos. La enterobactina es un poderoso quelante que *E.coli* produce con rapidez en condiciones de déficit de hierro y que secreta al medio externo.

CRECIMIENTO DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS.

El cultivo es el proceso de propagación de los microorganismos en el laboratorio, aportando las condiciones ambientales adecuadas y los nutrientes necesarios. Debemos recordar que algunas de las bacterias que causan infecciones en seres humanos **no** son capaces de crecer en medios artificiales inertes. Cuando una célula bacteriana se coloca en un medio de cultivo nutricionalmente apto, aumenta de tamaño y, con el tiempo, se divide para formar dos células. Esto prosigue, lo que da lugar a una población de células vegetativas.

El crecimiento de las poblaciones bacterianas, en un sistema de cultivo cerrado, 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 medios de cultivo sólidos o líquidos, las condiciones se asemejan a las de un sistema cerrado, sin un aporte continuo de nutrientes. Si luego de sembrado el medio líquido se toman muestras a intervalos regulares, la representación gráfica de los datos (conteo de células viables vs. tiempo) dará la curva de crecimiento característica, que consta de 4 fases a saber:

- a. 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 un marcado aumento de los componentes macromoleculares y de la

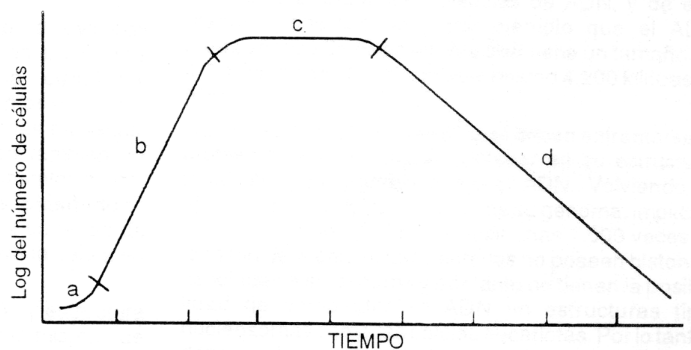


Fig. 5 - Curva de crecimiento bacteriano (sistema cerrado) Cultivo continuo. En algunos trabajos de investigación o de producción es conveniente tener a las bacterias en su fase de crecimiento exponencial durante un período prolongado.

actividad metabólica, casi sin división celular, asociado a un incremento de la susceptibilidad a los agentes físicos y químicos. Como vemos, la mal llamada fase de latencia implica intensa actividad metabólica.

- b.** Fase exponencial: Las células se dividen a una velocidad constante determinada por la naturaleza intrínseca de la bacteria y por las condiciones del medio. Existe un marcado aumento del número total de células viables, que puede ser expresado en forma exponencial. Próximo al final de esta fase, ocurre la liberación de **exotoxinas** por algunas de las bacterias que las producen.
- c.** Fase estacionaria: Eventualmente el agotamiento de los nutrientes o la acumulación de productos tóxicos determina el cese del crecimiento. Hay una pérdida de células por muerte, que es balanceada por la formación de nuevas células. Cuando esto ocurre, el conteo total de células se incrementa levemente, aunque el conteo de bacterias viables permanece constante. Sobre el final de esta etapa puede ocurrir la **esporulación** en aquellas bacterias que poseen este mecanismo de resistencia.
- d.** Fase de muerte: Luego de la fase estacionaria, la tasa de muerte se incrementa, el número de bacterias viables disminuye rápidamente, por lo que la curva declina en forma franca.

Cultivo continuo: En algunos trabajos de investigación o de producción es conveniente tener a las bacterias en su fase de crecimiento exponencial durante un período prolongado.