

MICROORGANISMOS

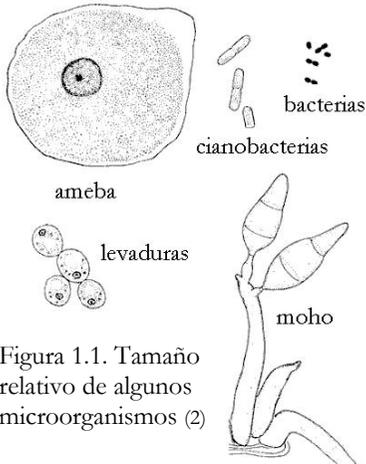


Figura 1.1. Tamaño relativo de algunos microorganismos (2)

Los organismos más sencillos tienen una sola célula y como se miden en micrómetros (μm) se los conoce como microbios o microorganismos. La organización unicelular se observa en los protozoos, las levaduras, algunas algas y la mayoría de las bacterias. Un tipo más complejo de organización biológica es la de los microorganismos pluricelulares. Aunque surgen en general a partir de una sola célula, en

estado maduro constan de varias células permanentemente unidas de un modo característico, lo cual le confiere una forma típica.

Los ambientes capaces de albergar a los microorganismos reflejan el amplio espectro de evolución de los mismos. Viven en animales y vegetales, mares y agua dulce, con y sin aire, a temperaturas comprendidas entre los puntos de congelación y ebullición del agua. Algunos han desarrollado ciclos de vida que incluyen una fase de latencia en respuesta a la falta de nutrientes. Los microorganismos se hallan capacitados para acometer una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse a diferentes ambientes (1). Por su poco peso pueden ser transportados por las corrientes de aire y estar en todas partes, pero las características del ambiente determinan cuáles especies pueden multiplicarse.

En los animales monogástricos la población bacteriana alcanza su máximo nivel en el intestino grueso y tiene impacto metabólico sobre el hospedador. En el rumiante la acción de los microorganismos que degradan la celulosa, contenidos en la panza o rumen, permiten al animal alimentarse de forrajes (3).

Numerosas especies bacterianas, algunas veces junto a protozoos y algas microscópicas, proliferan en las áreas expuestas

a la humedad. El 99% de toda la actividad microbiana en un ecosistema abierto ocurre sobre las superficies (4).

Las bacterias unicelulares y las actinobacterias filamentosos son procarióticos. Sus células carecen de membrana nuclear y mitocondrias, además poseen un solo cromosoma que se encuentra libre en el citoplasma y una pared celular rígida. Las células de los procariotas son, en general, mucho menores que las de los eucariotas; unas 10 veces menor en medidas lineales y por lo tanto unas 1000 veces menor en volumen (1).

Los mohos y levaduras forman parte de los hongos. Las levaduras son unicelulares en condiciones normales mientras que los mohos crecen como un sistema ramificado de filamentos. Se trata de organismos eucarióticos cuyas células, al igual que las de protozoos y algas, tienen un núcleo cerrado por una doble membrana porosa y llevan de dos cromosomas a más de veinte en algunas especies (5). Algunos protozoos del intestino y el suelo se alimentan de bacterias y presentan movimientos ligados a la fagocitosis que es la ingestión de partículas mediante invaginación de la membrana citoplasmática y formación de vesículas intracelulares (6).

Las bacterias son organismos pequeños, que miden uno o varios micrómetros. Las levaduras, en cambio, miden entre 6 y 12 μm . Los mohos son pluricelulares y aunque sus células aisladas miden a lo sumo 25 μm de largo, su conjunto se distingue a simple vista. Los hongos con reproducción sexual pueden tener cuerpos fructíferos de gran tamaño como los champiñones y otras setas, formados por millones de células (5).

DOMINIOS Y REINOS

Las dificultades lógicas para ubicar a los microorganismos en los vegetales o los animales desaparecieron al admitir un tercer reino, el de los protistas. Este reino incluía a todos aquellos organismos que se diferencian de las plantas y los animales por su falta de especialización morfológica, siendo la mayoría unicelulares. Luego los protistas fueron divididos en dos grupos claramente definidos sobre la base de la estructura celular. Los eucarióticos eran protistas superiores. Este grupo comprendía a los protozoos, hongos y algas. Los procarióticos eran protistas

inferiores e incluían a las diversas bacterias y cianobacterias (2). Otra clasificación de los seres vivos estaba fundada en el reconocimiento de cinco reinos (7).

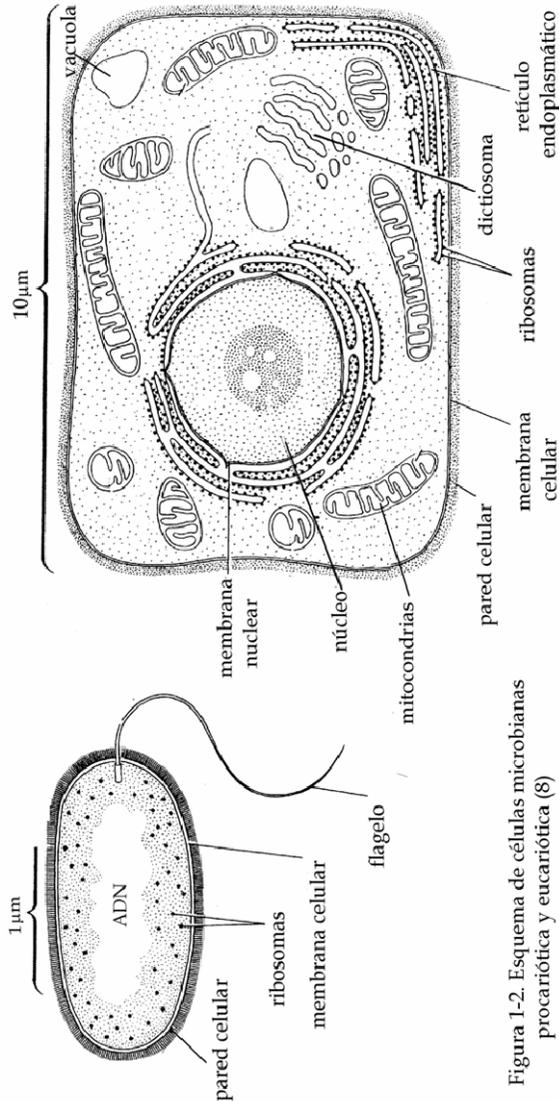


Figura 1-2. Esquema de células microbianas procariótica y eucariótica (8)

Los estudios ultraestructurales, bioquímicos y de la biología molecular modificaron la clasificación de los seres vivos. Los

procariotas fueron ubicados en el reino Bacteria (dominios Bacteria y Archaea) mientras que el dominio Eucarya reunió a los microorganismos en los reinos Protozoa, Chromista y Fungi, pero algunos se encuentran en Plantae (8).

Cuadro 1.1. Reinos de los seres vivos (9)

Tipo celular	Reinos	Organismos
Eucariótico	Animalia	esponjas, corales, gusanos, moluscos, insectos, vertebrados
	Plantae	algas verdes y rojas, musgos, hepáticas, coníferas, plantas con flores
	Protozoa	amebas, testáceos, radiolarios, foraminíferos, ciliados, zoo y fitoflagelados, esporozoos, mixomicetos, arqueozoos
	Chromista	algas, oomicetos, hifocitridiomycetos
	Fungi	levaduras, mohos, setas, bejines, microsporidios
Procariótico	Bacteria	proteobacterias, bacterias esporuladas, actinobacterias, bacterias verdes, espiroquetas, mixobacterias, cianobacterias
		arqueobacterias

Las arqueobacterias reúnen a especies metanógenas, halófilas extremas, termoacidófilas e hipertermófilas.

Las bacterias propiamente dichas comprenden a una gran variedad de organismos procarióticos: a) proteobacterias que necesitan de fuentes nutritivas orgánicas, por ejemplo *Pseudomonas* en el suelo y *Escherichia coli* en el intestino, así como especies que poseen pigmentos para la fotosíntesis (*Chromatium*), o dependen solamente de compuestos inorgánicos como *Thiobacillus* y *Desulfovibrio*, y las mixobacterias; b) Gram-positivas que contiene especies con una pared similar, como las bacterias lácticas de los productos lecheros y los vegetales en descomposición (*Streptococcus*, *Lactobacillus*), las formadoras de endosporos (*Bacillus* y *Clostridium*) y actinobacterias filamentosas (*Streptomyces*); c) cianobacterias (*Nostoc*) con fotosíntesis semejante a la de las plantas; d) bacterias verdes fototróficas con bacterioclorofila que dependen o no de los sulfuros; y otras divisiones menores (1).

Los virus no fueron considerados pues son partículas acelulares diferentes de todos los otros microorganismos, que pueden proliferar y replicarse solamente dentro de células vivas. Por otra parte, parece que las células eucarióticas surgieron de antepasados procarióticos, pues hay pruebas del origen bacteriano de mitocondrias y cloroplastos (7).

MICROORGANISMOS PROCARIÓTICOS

La célula procariótica posee una cubierta celular muy diferente a la de los eucariotas y tiene solamente dos sistemas internos principales: una molécula circular de ADN con cadena helicoidal doble y un citoplasma no diferenciado donde se halla inmerso ese ADN. La longitud del anillo de ADN que codifica toda la información genética de la célula apenas es superior a un milímetro (5). El citoplasma contiene gran número de ribosomas que cumplen la función de enlazar los aminoácidos formando proteínas. Los ribosomas procarióticos son más pequeños que los eucarióticos (1).

Un gen, o unidad de información genética, está representado por una secuencia específica de bases en un segmento continuo del ADN. El conjunto de genes se denomina genoma. La doble hélice formada por las dos cadenas de nucleótidos consta de varios millones de pares de bases y la información total de la bacteria se despliega en un conjunto de varios miles de genes. En las bacterias, la información genética codificada en un gen es transferida a un ARN mensajero (ARN-m) durante la transcripción. Los aminoácidos son reunidos en una cadena polipeptídica, según la secuencia determinada por el ARN-m, en un proceso de traducción que implica la participación de los ARN que transfieren los aminoácidos (ARN-t), los ribosomas, varias enzimas y ATP (trifosfato de adenosina, con alta energía). En los procariotas y eucariotas la clave genética y la bioquímica esencial de la transcripción y la traducción son las mismas, pero no así las señales de control (10).

La flexibilidad metabólica de una bacteria es enorme. Debido al pequeño tamaño, una bacteria esférica tiene espacio para no más que cien mil moléculas de proteínas. Las enzimas no están

corrientemente dentro de la célula, sino que su síntesis es inducida por la presencia del sustrato en el ambiente (1).

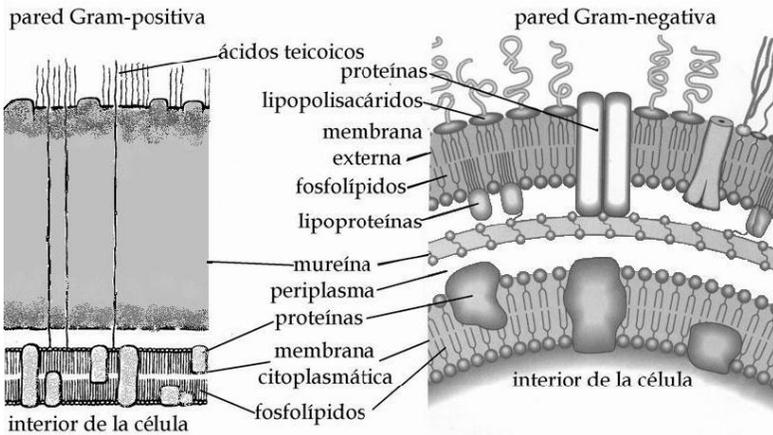


Figura 1.3. Paredes celulares de bacterias (11, 12)

BACTERIAS

Las paredes celulares de muchos de los procariontes poseen un componente químico común: el péptidoglucano o mureína, que es el responsable de la forma y consistencia de la pared. El péptidoglucano es un extenso polímero compuesto por β -subunidades alternas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. Esta última molécula es similar a la N-acetilglucosamina, pero tiene una unidad de ácido láctico unida al tercer átomo de carbono de la glucosa. El ácido láctico sirve como punto de unión a una cadena lateral lineal constituida unos pocos aminoácidos D o L. Las moléculas de péptidoglucano que rodean la célula están entrelazadas entre sí mediante puentes formados por estos aminoácidos (1).

La cantidad de péptidoglucano de la pared de las células bacterianas varía desde el 90% en la pared de algunas bacterias Gram-positivas hasta menos del 10% en las bacterias Gram-negativas. El término Gram-positivo hace referencia a la capacidad para retener el colorante violeta cuando se agrega alcohol, al hacer la tinción de Gram. Las bacterias Gram-negativas no retienen a este colorante (5). La penicilina y otros antibióticos β -

lactámicos que interfieren con la biosíntesis de la pared celular llevan a la producción de protoplastos carentes de pared bajo condiciones osmóticas apropiadas. El término esferoplasto se suele usar para los casos en que persisten restos de pared (1).

La pared celular de las bacterias Gram-positivas contiene pequeñas cantidades de proteínas y polisacáridos, a menudo también ácidos teicoicos (polímeros de ribitol-fosfato o glicerol-fosfato unidos mediante enlaces fosfo-diéster) o de ácidos teicourónicos. Estos ácidos están unidos al péptido-glucano por los fosfatos. En las proteobacterias, Gram-negativas, la capa interna de la pared celular es pobre en péptidoglucano y la capa externa rica en lipoproteínas y lipopolisacáridos, los cuales constituyen más del 80% del peso seco de la pared. El espacio entre la membrana externa y la capa de péptidoglucano, llamado periplásmico, contiene un gran número de proteínas enzimáticas.

La capa de péptidoglucano está rodeada por una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos y fosfolípidos con proteínas en túnel (porinas) que la atraviesan. El lipopolisacárido consiste en un disacárido de glucosamina cuyos grupos alcohol están esterificados con fosfatos y ácidos grasos de 12, 14 ó 16 carbonos (lípidos A), unido a un polisacárido externo (10).

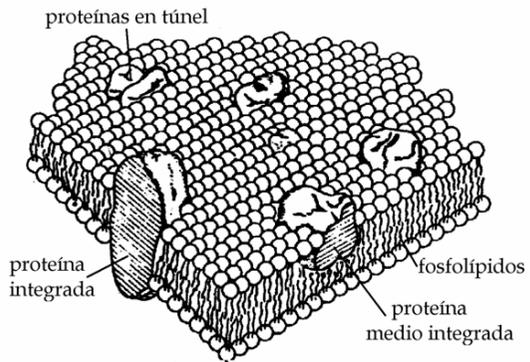


Figura 1.4. Membrana citoplasmática (2)

Los micoplasmas son bacterias carentes de pared celular y parecen protoplastos, pero son más resistentes a la lisis osmótica debido a la naturaleza de su membrana citoplasmática, la que tiene esteroides o lipoglucanos (1).

La membrana citoplasmática bacteriana constituye solamente 8-15% del peso celular seco y contiene alrededor del 70-90% de los lípidos celulares. Esta membrana, de unos 5 nanómetros de

grosor, consiste de una doble capa lipídica con los extremos hidrofóbicos de los fosfolípidos en el interior y las cabezas hidrofílicas expuestas sobre ambas superficies. También tiene incorporadas proteínas que la atraviesan o están inmersas parcialmente en ella. Otras proteínas que se hallan en la superficie de la membrana son conocidas como proteínas periféricas (14).

Aislamiento de microbios del polvo ambiental

Vertir en una caja de Petri unos 15 mL de agar recuento estéril, previamente licuado en baño de agua hirviendo. Dejar gelificar y luego exponer la placa al aire dejando sedimentar el polvo ambiental durante 30-60 minutos. Incubar a 27-30°C. A los dos y siete días examinar las colonias presentes.

Agar recuento: triptona 5 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 1 g, fosfato dipotásico 2 g, agar 15 g, agua 1 L (13).

Las proteínas de la membrana intervienen en la entrada y salida de sustancias de la célula, y son específicas para grupos de moléculas estrechamente relacionadas. Las sustancias hidrofóbicas difunden fácilmente pero no los iones.

La membrana es el sitio donde se genera la energía respiratoria en las bacterias que posean tal actividad metabólica. Las bacterias fototróficas tienen membranas internas (vesículas o láminas paralelas cromatóforas) derivadas de la membrana citoplasmática donde se obtiene la energía fotosintética (10).

Muchas bacterias están dotadas de flagelos que les permiten moverse. Si los flagelos se encuentran concentrados en uno o ambos extremos de la célula se denominan polares; si están distribuidos por toda la superficie reciben el nombre de peritricos (5). Los flagelos posibilitan la quimiotaxis, que es el movimiento hacia la fuente de nutrientes o el alejamiento de un entorno químicamente hostil. La proteína del flagelo, flagelina, está unida a un gancho asociado a un cuerpo basal que causa el movimiento giratorio del mismo. La base del flagelo está

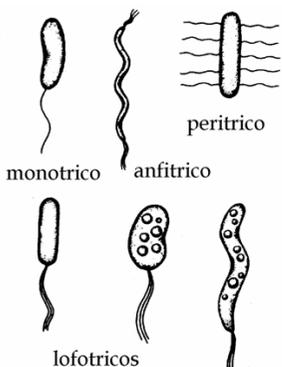
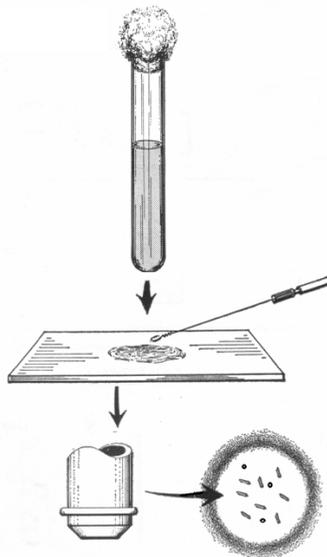


Figura 1.5. Ubicación de los flagelos bacterianos (10)

Tinción de Gram

Tomar con un asa una porción de cultivo bacteriano, depositarlo sobre una gota de agua y hacer un extendido sobre un portaobjetos. Dejar



secar y fijar por calor. Ponerlo sobre un soporte y cubrirlo con una solución de violeta cristal. Luego de 1 minuto agregar solución de yodo. Después de 1 minuto, lavar con agua. Decolorar con alcohol 96°. Lavar con agua y cubrir con una solución de safranina durante 1 minuto. Lavar con agua y secar.

Colocar una gota de aceite para inmersión. Llevar el portaobjetos a la platina de un microscopio. Mirar a través del objetivo de bajo aumento (10x) y una vez enfocado el objeto mover el revólver para colocar el objetivo de inmersión en aceite (100x). Levantar el condensador acercándolo a la platina. Ajustar el enfoque mediante el tornillo micrométrico. Regular la cantidad de luz por medio del diafragma.

Las bacterias Gram-negativas se tiñen de rojo anaranjado y las Gram-positivas adquieren color violeta.

Cristal violeta: disolver 1 g de colorante en 20 mL de etanol 96° y añadir 80 mL de oxalato de amonio al 1%.

Safranina: disolver 0,25 g de colorante en 10 mL de etanol 96° y agregar 90 mL de agua.

Solución de yodo: mezclar en un mortero 1 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio, disolver con 100 mL de agua (15).

Coloración de flagelos

Dejar correr una gota del cultivo líquido de 12-18 horas, sobre un portaobjetos nuevo, limpio y tibio. Secar al aire. Mezclar en el momento de usar: 2 mL de alumbre de potasio al 12%, 1 mL de ácido tánico al 20%, 1 mL de agua, 1,5 mL de etanol 96° y 0,3 mL de fucsina básica al 6% en etanol 96°. Volcar de inmediato sobre el portaobjetos y dejar 10 minutos. Lavar con agua. Las bacterias y los flagelos se tiñen de color rojo (16).

Se puede inferir la motilidad de las bacterias al observar su desplazamiento rápido a través del campo microscópico cuando se enfoca una gota de cultivo reciente, colocada entre sobre el porta y bajo el cubreobjetos (17).

anclada en la membrana citoplasmática, asociada al péptido glucano y en las Gram-negativas a la membrana externa (1).

Las bacterias sin flagelos carecen de movimiento, excepto aquéllas que se deslizan sobre el sustrato por ejemplo *Cytophaga*.

La superficie bacteriana Gram-negativa también suele tener otras estructuras proteicas filamentosas, las fimbrias (pili I) que participan en la adhesión a diversas superficies, por ejemplo las mucosas animales, y los pelos de conjugación (pili F) (18).

Coloración negativa

Sobre un portaobjetos se mezcla una gota del cultivo con tinta china, o nigrosina al 10%, y se coloca un cubreobjetos. La cápsula aparece como un halo claro alrededor de la célula (15).

A veces las bacterias acumulan capas de polisacáridos sobre la superficie exterior como ocurre con *Leuconostoc mesenteroides*, organismo que convierte rápidamente a una solución de azúcar de caña en una jalea de dextrano (1,6- α -glucano), o *Acetobacter aceti* variedad *xylinum*, el cual secreta celulosa formado una cubierta coriácea que rodea a las células y da cohesión a la colonia (10). La cápsula es una capa densa y bien definida de polisacáridos (*Acinetobacter* sp) o polipéptidos (*Bacillus anthracis*), mientras que la capa mucosa es una masa difusa de polímero. La cápsula no es esencial para la vida y no siempre está presente, en muchos casos el material capsular puede ser separado en forma de limo, por agitación u homogeneización. Otras bacterias, como *Sphaerotilus natans*, forman una vaina o envoltura tubular de heteropolisacáridos que contiene una cadena de células (1).

Coloración de endosporos

Cubrir el extendido fijado por calor, con verde de malaquita al 2%. Calentar hasta emisión de vapores, dejar enfriar y volver a calentar 3 ó 4 veces más. Lavar con agua. Cubrir con safranina al 0,25% durante 1 minuto. Lavar con agua y secar. Los endosporos se tiñen de verde y las células somáticas de color rojo anaranjado (13).

Numerosas eubacterias y también arqueobacterias, poseen una envoltura exterior proteica o capa S que suelen perder en las condiciones óptimas del laboratorio. Esta capa favorece la

adhesión al sustrato para permitir la acción de las exoenzimas en las bacterias saprobas y la virulencia en las patógenas (19).

Un pequeño grupo de eubacterias (*Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Heliobacterium*) poseen endosporos. Son células cuyas moléculas pueden encontrarse en estado vítreo lo que les confiere la cualidad de permanecer latentes por muchos años, y resultan altamente resistentes al calor y otros agentes físicos así como a productos quimiotoxicos que causan la muerte de las células somáticas. Puesto en el ambiente apropiado, el endosporo da origen a una nueva bacteria (5).

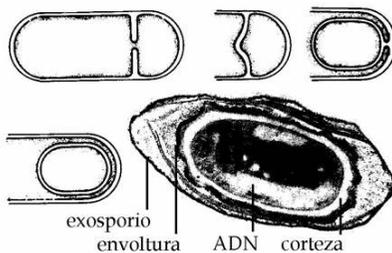


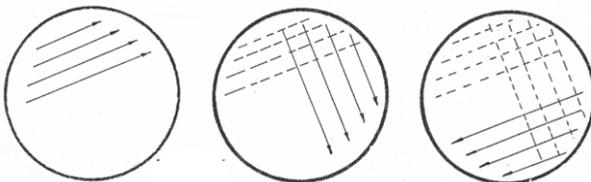
Figura 1.6. Formación de endosporos (10)

Aislamiento de bacterias esporuladas

Calentar una suspensión de muestra por 10 minutos en un baño de agua a 80°C. Flamear el asa hasta que tenga color rojo brillante y dejar que se enfríe dentro de la zona de convección del mechero. Tomar una gota de la suspensión y extenderla sobre la superficie de una placa de agar para recuento estéril haciendo las primeras estrías. Flamear el asa y hacer la segunda serie de estrías con el asa vacía. Flamear otra vez el asa y hacer la tercera serie de estrías con el asa vacía. Incubar las cajas con la tapa hacia abajo



a 25-30°C durante 48 horas. Después de la incubación en la estufa, el crecimiento es confluyente en los trazos iniciales y las colonias están bien aisladas a lo largo de las últimas estrías (13).



Los endosporos contienen ácido dipicolínico, una sustancia no hallada en la forma somática, en la proporción de 10-15% del peso seco del esporo. Son varias las cubiertas que rodean al citoplasma del endosporo: membrana citoplasmática, pared celular, corteza

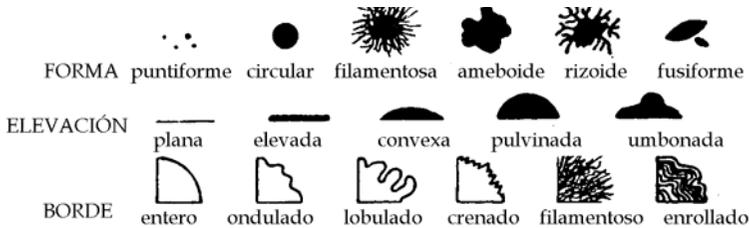
con péptidoglucanos, envolturas interna y externa polipeptídicas y exosporio (1).

Una de las inclusiones más comunes en el citoplasma son los glóbulos de poli- β -hidroxibutirato. Otras bacterias contienen glicógeno, un polímero de glucosa, o gránulos de polifosfatos, gránulos de azufre elemental o cristales de magnetita (Fe_3O_4). Las bacterias que flotan en lagos y mares suelen tener vesículas de gas (1).

Las bacterias forman colonias características sobre la superficie del sustrato, que tienden a adoptar una forma circular creciendo por adición de células a su perímetro.

Colonias microbianas

Al observar una colonia se describe color, brillo, forma, elevación, borde y pigmento del medio (13)



Al extenderse la colonia sobre el agar se observa que en el crecimiento participan unos elementos en anillos y otros en sectores. Debido a la propagación centrífuga, a todos los sectores los va formando la progenie de un antepasado común. Algunos sectores se distinguen del resto porque las células difieren en su ADN debido a mutaciones espontáneas. Las bacterias de un anillo comparten algunas propiedades entre sí pero no están emparentadas, pero tienen parentesco directo con las de la zonas precedente y la siguiente (20).

Las bacterias generalmente se multiplican por fisión binaria. Después del crecimiento de la célula, aparece el septo y las células se separan o permanecen unidas con formas características: pares, cadenas, paquetes cúbicos y acúmulos planos irregulares entre las