

BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

MÓDULO AUXILIAR I: PROCESOS BIOLÓGICOS

- Microbiología Básica
- Microorganismos y su medio ambiente
- Fenómenos de transporte

MICROBIOLOGÍA BÁSICA

LA POSICIÓN DE LOS ORGANISMOS EN LA NATURALEZA

Los tres reinos: Animales, Plantas y Protistos

Para distinguir las plantas de los animales podemos tener en cuenta:

- tipo de alimentación
- constitución de las paredes celulares
- la capacidad de movimiento
- la posibilidad de sintetizar determinadas sustancias

Los **animales** se alimentan de sustancias orgánicas ya formadas (heterótrofos), que son elaboradas, digeridas y resorbidas en el interior del cuerpo (en el tracto intestinal). El fin del desarrollo animal consiste en la consecución de superficies interiores de absorción. Éste principio se ve realizado en toda la escala animal, desde los celentéreos hasta los vertebrados superiores.

Las **plantas** fabrican las sustancias necesarias para la formación de su cuerpo a partir de compuestos inorgánicos (autótrofos) y utilizan la energía solar como su fuente de energía. Las células y los tejidos con actividad fotosintética y provistos de pigmentos absorbentes están orientadas hacia el exterior formando altas superficies externas.

Los **protistos, primicias o seres primitivos**, se diferencian de los animales y las plantas por una diferenciación morfológica muy reducida; la mayoría son unicelulares.

Encontramos los protistos superiores e inferiores.

Los *protistos superiores* se parecen, en cuanto a la constitución de sus células a las plantas y animales; son eucariotas. En éste grupo encontramos las algas, los hongos y los protozoos.

Los *protistos inferiores* se diferencian considerablemente del resto de los organismos en cuanto a su constitución celular. Encontramos las *bacterias* y las algas azules; son procariontes. Dentro de las bacterias encontramos los parásitos intracelulares (rickettsias).

La denominación de microorganismos se refiere a las reducidas dimensiones, y corresponden a la denominación de protistos.

Los **virus** se contraponen a los demás organismos por ser partículas no celulares; no pueden autorreproducirse sino que requieren células vivas para su multiplicación (reproducción).

Todos los seres vivos presentan en común un conjunto de sustancias que componen sus piezas básicas, que son el ácido desoxirribonucleico (DNA), el ácido ribonucleico (RNA) y las proteínas.

La unidad física básica es la célula que a grandes rasgos podemos decir que está formada por una membrana exterior, un citoplasma y un núcleo que puede o no estar rodeado por una membrana. En el citoplasma se encuentran una serie de estructuras conocidas como organelas y vacuolas que cumplen diversas funciones.

Encontramos diferencias notables entre las células de las bacterias y las algas azules y entre los animales y las plantas, que nos permiten diferenciarlos en dos grandes grupos:

Los **eucariotas** disponen de un verdadero núcleo que contiene un conjunto de cromosomas que tras su duplicación se separan en un proceso denominado mitosis. El citoplasma contiene mitocondrios y plástidos. La membrana citoplasmática se continúa hacia el interior en el retículo endoplasmático y la membrana nuclear.

Los **procariotas** no poseen un núcleo rodeado por una membrana. El DNA, incluido en el nucleoplasma, se encuentra libre en la célula. La subdivisión de la célula en cavidades separadas se halla menos marcada; faltan los mitocondrios y los cloroplastos. Los órganos encargados del movimiento son más sencillos y con una estructura básica distinta de los eucariotas.

Mientras que las plantas y los animales dependen totalmente del oxígeno, varios grupos de procariotas pueden vivir en ausencia de aire (en condiciones anaeróbicas) y obtener la energía necesaria para el crecimiento por fermentación o por oxidación anaeróbica. Otros grupos pueden utilizar la energía luminosa y construir la materia celular, ya sea a partir de compuestos orgánicos o a partir del anhídrido carbónico. Otras bacterias son capaces de obtener energía por oxidación de compuestos o elementos inorgánicos.

En los procariotas es notable observar la multiplicidad, la flexibilidad fisiológica, las altas tasas de síntesis, el rápido crecimiento, la sencilla constitución celular y la estructura poco complicada del material.

Participación en el ciclo de la materia

Los microorganismos tienen una importante función en la vida en la tierra ya que son los encargados de mineralizar el carbono que, a través de las plantas verdes, ha pasado a formar parte de compuestos orgánicos y se ocupan de mantener un delicado equilibrio.

Las plantas verdes tendrían que detener la fijación de anhídrido carbónico si los animales inferiores y los microorganismos no se ocupasen de la continua mineralización de la materia orgánica, regenerando el anhídrido carbónico. La dependencia de todos los seres vivos de la tierra queda muy clara en el ciclo del carbono.

La alta capacidad fotosintética de las plantas las podemos notar teniendo en cuenta que en el aire atmosférico hay sólo 0.03 % de anhídrido carbónico.

Los microorganismos del suelo y del agua convierten el carbono en dióxido de carbono en el ciclo de mineralización e incorporan al ciclo los restantes bioelementos que se hallan unidos en las plantas y animales.

En el mecanismo bioquímico de fijación fotosintética del anhídrido carbónico que llevan a cabo las plantas participan los azúcares y compuestos relacionados. La glucosa y otros azúcares constituyen los sustratos predominantes en el proceso de mineralización y son las sustancias preferidas por la mayoría de los microorganismos heterótrofos.

Los microorganismos como plantas beneficiosas.

Reconocemos los perjuicios que los microorganismos le causan al hombre, a las plantas y a los animales. Si bien los microorganismos se presentan como perjudiciales en la naturaleza y en la industria, su beneficio supera los puntos negativos que presentan.

Se emplean en procesos para catalizar procesos parciales de largas cadenas sintéticas; las transformaciones bacterianas superan a las químicas en cuanto a especificidad y rendimiento.

Debemos destacar que algunas de las materias primas disponibles, sobre todo en grandes cantidades como el petróleo, el gas natural o la celulosa, solo pueden ser utilizados por microorganismos y pueden ser transformados ya en material celular o en productos intermedios que se segregan por la célula. Los microorganismos ocupan una posición monopólica en la mejora de las materias primas no convencionales como el petróleo, gas natural y el carbón.

Características generales:

La principal característica de los microorganismos es su diminuto tamaño de los individuos. El diámetro de la mayoría de las bacteria no es superior a la milésima de milímetro ($1 \text{ micrón} = 1 * 10^{-6} \text{ metros} = 1 * 10^{-3} \text{ milímetros}$). Los datos se dan en milimicras o en nanómetros ($1 \text{ milimicras} = 1 \text{ nanómetros}$).

Una característica muy importante que presentan es su relación superficie / volumen ya que es muy elevada, poseen una **elevada superficie específica**. Por ejemplo si tenemos un cubo de un centímetro de arista (1 cm^3) compuesto de cubos de una micra de arista, obtenemos 10^{12} cubos de una micra cúbica cada uno. La superficie de esos cubos es 10000 veces superior a la de los cubos compactos.

Esta elevada relación superficie / volumen trae aparejado un alto *intercambio de materia*.

Los microorganismos presentan una elevada **flexibilidad fisiológica**, las bacterias poseen un elevado poder de adaptación (capacidad de adaptarse), ya que les es necesario para su subsistencia. Vemos que las bacterias se las encuentran en regiones árticas, en el agua y los estratos de la atmósfera. Debido a su poco peso los microorganismos pueden ser arrastrados por corrientes de aire.

Encontramos microorganismos en todos lados, es el medio quien regirá el tipo que va a multiplicarse. Mediante la creación de las *condiciones selectivas* en un tubo de ensayo pueden obtenerse un **cultivo de enriquecimiento** y a partir del mismo un cultivo puro de la mayoría de microorganismos conocidos a partir de una pequeña cantidad de tierra o barro.

Las pequeñas dimensiones permiten estudiar poblaciones de 10^8 hasta 10^{10} células en un tubo de ensayo o en una sola cápsula de Petri., y probar con unos medios ínfimos y un espacio muy pequeño mutaciones o transferencia de característica

LA CÉLULA Y SU ESTRUCTURA

La célula vegetal embrionaria puede servirnos como representante de las células vegetales y animales: la **célula eucariota**. Como prototipo de **célula procariota** puede utilizarse una célula bacilar.

Todas las células constan de **núcleo** y **citoplasma**. Quedan separadas del exterior mediante la **membrana citoplasmática**. En las células vegetales y en las de muchos microorganismos hay además una **pared celular** con función principalmente mecánica. La parte de la célula que queda incluida dentro de la pared celular se denomina **protoplasto**.

La estructura del núcleo y su tipo de división son las características mas sobresalientes y básicas que separan las células eucariotas de las procariotas.

La célula eucariota (eucito)

El núcleo (interfásico) esta rodeado por la membrana nuclear, formada por dos capas y que presenta poros. El DNA, que constituye el material hereditario (genoma), está repartido en un numero de subunidades, los cromosomas; estos son solo visibles ante la división nuclear. La división nuclear se lleva a cabo durante la mitosis, que cumple dos funciones:

- La duplicación exacta del material genético y la duplicación de los cromosomas y
- la distribución de los dos núcleos hijos de las dos dotaciones cromosómicas complejas

El núcleo contiene parejas de cromosomas, de las que cada cromosoma procede de un progenitor. Mediante la mitosis los cromosomas se distribuyen por igual entre ambas células hijas.

- durante la **profase** se hacen visibles los cromosomas ya divididos y se disuelve la membrana del núcleo,
- durante la **metefase** los cromosomas se ordenan en la placa ecuatorial;
- en la **anafase** cada uno de los cromosomas resultantes de la división es arrastrado por los filamentos del huso hacia los polos de la célula;
- durante la **telofase** los cromosomas recién divididos son rodeados de una membrana nuclear y el núcleo vuelve a adoptar la forma funcional.

En la fase de la *mitosis* se acortan los cromosomas y se hacen visibles, se disponen en un plano (*plano ecuatorial*) y las mitades de los cromosomas ya divididos se separan mediante un aparato contráctil denominado *huso acromático*. El huso desaparece, los cromosomas se hacen visibles y los núcleos hijos quedan rodeados de nuevo por la membrana nuclear.

Todos los animales y plantas superiores sufren durante la reproducción sexual un cambio de fase nuclear. Durante la fecundación las células germinales o gametos y sus núcleos se fusionan para formar el **zigoto**. El núcleo masculino aporta el mismo número de cromosomas (n) que el núcleo femenino. El núcleo del cigoto presenta por tanto dos conjuntos cromosómicos o genomas ($2n$). Mientras que los gametos son **haploides** (una dotación), las células somáticas son **diploides** (dos dotaciones). De la generación sexual a la siguiente tiene que llevarse a cabo una reducción del número diploide al número haploide. Este proceso de reducción cromosómica se denomina **meiosis** o **división reduccional**.

La *meiosis* es un proceso básico en los organismos que se reproducen sexualmente; cumple dos misiones:

- la combinación de las células hereditarias del padre y de la madre,
- la reducción de cromosomas.

La meiosis se inicia con el apareamiento de los cromosomas: cada cromosoma se aparea con el cromosoma correspondiente del otro progenitor (homólogo). En este estado puede producirse, mediante la ruptura y reunión cruzada, el intercambio de porciones de cromosomas homólogos que tengan la misma longitud. Finalmente, se produce una doble división (formación del huso) de los cromosomas apareados y dividido dando lugar a cuatro células cuyos núcleos presentan un número haploide de cromosomas.

Entre los elementos básicos del citoplasma se encuentran las membranas. La *membrana citoplasmática* limita el *protoplasto* hacia el exterior con la pared celular y se continua hacia el interior con el *retículo endoplasmático*. Este se compone de *vesículas* y de *cisternas*, cuya superficie se halla recubierta de ribosomas. El aparato de Golgi está formado por paquetes de cisternas.

Los plástidos más importantes y más típicos de la célula eucariota son los mitocondrios y los cloroplastos. Todas las células eucariotas aeróbicas contienen **mitocondrios** (orgánulos de forma variable ricos en lípidos). Sirven para la respiración y para la obtención de energía oxidativa y contiene los enzimas para la síntesis de grasas, del ciclo de los ácidos tricarbónicos, de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa. Los **cloroplastos** transforman la energía luminosa en energía química. Los cloroplastos de las plantas superiores son lenticulares; las

membranas paralelas encierran una sustancia básica, el *estroma*. Este se halla atravesado por membranas paralelas que llevan los pigmentos activos en la fotosíntesis. Los plástidos son formaciones ricas en lípidos que contienen DNA.

La célula procariota (protocito)

En el microscopio nunca se ve una membrana nuclear. La región nuclear se continua con el citoplasma.

No se ha comprobado una distribución del material que contiene DNA en subunidades.

Faltan totalmente los plástidos del tipo de los mitocondrios y los cloroplastos. La distribución dentro de la célula es notablemente inferior que lo célula eucariota.

Las bacterias son muy pequeñas. La mayoría de las bacterias tienen forma bacilar, con un grosor no superior a 1 micra y una longitud no superior a 5 micras.

Las bacterias se multiplican por lo general por división binaria. Tras el alargamiento de la célula construyen de fuera hacia dentro, paredes transversales que van progresando y las células hijas se separan. Sin embargo, en muchas bacterias, las células permanecen unidas en características durante cierto tiempo tras su división en condiciones ambientales determinadas. Según sea el plano de división y el número de planos celulares pueden distinguirse entre bacterias esféricas parejas (Diplococcus), cadenas (Streptococcus), placas o paquetes (Sarcina). También los bacilos pueden presentarse como parejas o cadenas.

Composición química de la bacterias:

Carbono-----	50-55 %
Nitrógeno-----	10-15 %
Fósforo-----	2-6 %
Hidrógeno-----	10 %
Oxígeno-----	20 %
Azufre y otros elementos	

EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

Metabolismo

Conjunto de reacciones bioquímicas realizadas en el interior de la célula. Están catalizadas por enzimas

Catabolismo

Conjunto de reacciones por las cuales los microorganismos generan energía

Anabolismo

Conjunto de reacciones mediante las cuales los microorganismos consumen energía.

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Composición de los medios de cultivo

El crecimiento de los microorganismos depende básicamente de la disponibilidad de agua. Los hongos se forman a partir de un contenido de agua del 12 %, las bacterias recién cuando es superior al 20 %.

Para sintetizar sustancia celular se requieren materias nutritivas. En total tienen que estar en el medio en forma de compuestos utilizables todos los elementos que se requieran para la formación de la sustancia celular.

Los **macroelementos** se requieren en grandes cantidades: carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro.

Muchos seres vivos dependen de uno u otro de los siguientes **microelementos** u **oligoelementos**: manganeso, molibdeno, zinc, cobre, cobalto, níquel, vanadio, boro, cloro, sodio y silicio. La mayoría de estos elementos de los que solo se requieren trazas, se encuentran en forma de impurezas en las sales de los macroelementos.

Deben existir otras condiciones aparte de las ya mencionadas, condiciones secundarias para que resulte el crecimiento en un medio dado. Los microorganismos dependen de una determinada concentración de los compuestos químicos y especialmente de los iones H^+ , de una relación equilibrada entre los distintos iones, de una determinada relación redox y de muchas otras condiciones no estudiadas todavía.

Los microorganismos existentes y determinados mutantes defectuosos requieren partes esenciales de la célula que son incapaces de producir, estos productos secundarios se denominan **factores de crecimiento** (sustancia complementarias o suplementarias); pueden ser aminoácidos, vitaminas, purinas u otras sustancias.

Auxotróficos son los organismos que requieren algún factor de crecimiento; y si la auxotrofia a ocurrido por mutación y no requieren elementos se denomina **prototrófica**.

El dióxido de carbono aparte de ser la fuente principal de carbono para los organismos C-autótrofos, cumple numerosas funciones catalíticas en los organismos C-heterótrofos y se necesita para sintetizar distintos componentes celulares. A menudo no es perceptible el requerimiento de CO_2 ya que se forma en grandes cantidades en la degradación de los productos orgánicos.

Tenemos un **medio de cultivo sintético** cuando la solución nutritiva puede prepararse con compuestos químicos definidos. Se intenta de proporcionar a cada microorganismo el mínimo de sustancias nutritivas que requiere y desarrollar un medio mínimo en el que no haya más elementos que los necesarios para el crecimiento.

Encontramos los **medios de cultivo complejos**, cuando las sustancias nutritivas dependen de la presencia de soluciones de compuestos no perfectamente conocidos que se encuentran en ciertos productos naturales y cuya composición exacta no se conoce pero se puede estimar (por ejemplo contenido total de proteínas sin especificar que tipo).

Para obtener **medios de cultivo sólidos** se le agregan a las soluciones nutritivas líquidas un solidificante que da una consistencia gelatinosa. Un solidificante ideal es el *agar*. Y cuando se requiere un medio de cultivo sólido sin componentes orgánicos se utiliza como solidificante el *gel de sílice*.

Condiciones del crecimiento

Aparte de encontrarse todas las condiciones nutritivas requeridas, el crecimiento depende también de la *concentración de iones hidrógeno*, la *temperatura*, la *presión osmótica*, *pH del medio de cultivo*, ya que los iones H^+ y OH^- son los iones de mayor movilidad y pequeñas

alteraciones en su concentración presentan efectos muy importantes. Por ello es muy importante establecer el pH óptimo para que se inicie el crecimiento y mantenerlo durante el mismo.

La mayoría de los organismos presentan un crecimiento óptimo cuando la concentración de los iones H^+ y OH^- son próximas, esto es un pH 7,0. Muchas bacterias prefieren pH más elevados, en un medio ligeramente *alcalino*; y sólo unos pocos organismos toleran los medios *ácidos* o son incluso acidófilos. Los hongos prefieren medios ácidos, de bajo pH.

Si se inoculan con una muestra de suelo medios de cultivo a distintos pH, a pH 5,0 crecen preponderantemente hongos y a pH 8,0 crecen sobre todo bacterias.

El **mantenimiento de un determinado pH** durante el crecimiento es importante sobre todo en aquellos microorganismos que elaboran ácidos pero que no los toleran (lactobacilos, enterobacterias, muchos pseudomonas). Para evitar la destrucción a causa de los ácidos producidos se utilizan sustratos no fermentables (en cultivos de larga duración) o se tampona el medio de cultivo. Los fosfatos ya desempeñan un cierto efecto tampón para pH superiores a 7,2. Cuando la secreción de ácidos es superior se recomienda la adición de carbonato cálcico o bicarbonato sódico.

Con relación a la **temperatura de cultivo** se presentan distintos comportamientos. La mayoría de las bacterias del suelo y del agua son *mesófilas*, sus temperaturas óptimas oscilan entre 20 y 45 °C. Encontramos algunas bacterias *termófilas*, cuya temperatura óptima es superior a 45 °C.

Luego a éstas se contraponen las *psicrófilas*, organismos preponderantemente marinos cuya temperatura óptima es inferior a 20 °C. Se denominan *termovalentes* aquellas bacterias cuya temperatura óptima oscila entre los mismos límites que las mesófilas.

La mayoría de las bacterias son bastante tolerantes en lo que respecta a la **presión osmótica** del medio; muchas crecen con un contenido de sales del 0,1 al 10 %.

Todas las bacterias aeróbicas obligadas necesitan oxígeno como aceptor de electrones. Las bacterias que crecen en placas de agar y en películas líquidas delgadas expuestas al aire disponen de oxígeno suficiente. En los medios de cultivo líquidos de grosor considerable, las bacterias aeróbicas sólo crecen en la superficie; por debajo de esa capa superficial las condiciones se van haciendo más anaeróbicas. Para que los organismos aeróbicos del fondo puedan crecer, debe airearse, los organismos sólo pueden utilizar el oxígeno disuelto. En tanto que las sales minerales y los compuestos orgánicos pueden irse añadiendo a la solución la solubilidad del oxígeno es muy baja. El oxígeno no puede estar disponible en el medio por lo que deberá añadirse continuamente; afortunadamente los microorganismos se hallan adaptados a concentraciones muy bajas de oxígeno disuelto, pero éste no puede ser inferior a un contenido mínimo sin que ese vea perjudicada la respiración celular.

La velocidad de disolución del oxígeno puede aumentarse con superficies grandes de contacto entre las fases gaseosa y líquida y aumentando la presión parcial de oxígeno en la fase gaseosa. Algunos de los métodos empleados son:

- Cultivo en superficies planas
- Movimiento del líquido por medio de agitadores
- Rotación de los frascos alrededor de su eje longitudinal
- Pasando aire a presión por la columna líquida
- Percolación

La exclusión del oxígeno atmosférico es necesario para el crecimiento de bacterias anaeróbicas. Las **técnicas anaeróbicas** presuponen soluciones nutritivas preparadas y a las que se les ha hecho el vacío, frascos cerrados sin burbujas de aire, bombas de vacío, utilización de medios que absorban el oxígeno y otros mecanismos. Mediante la inclusión de agentes reductores a la solución pueden disminuirse hasta eliminarse los efectos tóxicos del oxígeno.

Entrada de sustancias a la célula

Antes de que las sustancias nutritivas puedan ser transformadas en el citoplasma tienen que ser atravesar las capas que limitan la célula. La pared celular no ofrece ninguna resistencia notable a las moléculas pequeñas ni a los iones, pero evita el paso de las macromoléculas. El verdadero límite de la célula, responsable del transporte selectivo de las sustancias nutritivas al interior de la célula, es la **membrana citoplasmática**.

Muchas sustancias nutritivas (como electrolitos y anelectrolitos) se acumulan en la célula en concentraciones superiores a aquellas que presentan en el medio externo; la concentración interior puede ser centenares de veces superior. Sólo se produce ésta acumulación cuando la célula dispone de energía (por oxidación o fermentación). Tiene que pensarse en un mecanismo de bombeo, mediante el cuál los sustratos son transportados activamente, con el consiguiente consumo de energía al interior de la célula en contra de un gradiente de concentración. Lo que se debe observar es la existencia de un **agente transportador** entre las capas externa e interna.

La *entrada de sustancia es específica*: sólo entran aquellos sustratos para los que se dispone de un mecanismo de transporte. En muchos casos, se ha puesto de manifiesto que el aparato transportador tiene carácter enzimático, es decir, puede ser inducido, es específico del sustrato y sólo se forma en las condiciones adecuadas para la síntesis proteica, entonces se habla de **permeasas**. La hipótesis encuentra su mejor fundamento en aquellas células que son **crípticas** para un sustrato determinado, esto es, disponen de todos los enzimas necesarios para la transformación del sustrato sin que éste pueda entrar en la célula.

Algunos sustratos y muchas sustancias extrañas a la célula penetran en ésta sin que sean transformados en forma activa. Frente al transporte activo tienen que considerarse dos tipos de permeabilidad que permiten el ingreso de sustancias hasta que la concentración en el interior iguale a la de la solución externa y que no requiere energía alguna (entrada pasiva de sustancias): se llama difusión simple a la entrada específica de sustancias en la célula.

El mecanismo denominado **difusión facilitada** se diferencia del transporte activo sobre todo por su independencia de la energía del metabolismo y por la dependencia que presenta la velocidad de transporte de la concentración de la sustancia que tiene que transportarse en la solución externa; mientras que en el caso del transporte activo la velocidad de transporte ya alcanza su máximo para concentraciones bajas en el exterior, en el caso de la entrada pasiva la velocidad de transporte va aumentando lentamente al aumentar la concentración externa. La difusión facilitada es también un proceso específico y debe llevarse a cabo por un medio de transporte.

TIPOS DE NUTRICIÓN

Para describir los tipos de nutrición tendremos en cuenta también las fuentes de energía, el dador de H y la fuente de C.

- *Fotótrofos* (fotosintéticos), son los organismos capaces de utilizar la radiación electromagnética (luz) como fuente de energía para su crecimiento.

- *Quimiótrofos* (quimiosintéticos), ellos obtienen la energía a partir de reacciones de óxido-reducción de los sustratos utilizados como sustancias nutritivas.
- *Litótrofos*, son capaces de utilizar dadores inorgánicos de H (H₂, NH₃, H₂S, Fe⁺⁺, CO y otros).
- *Organótrofos*, todos los organismos que utilizan compuestos orgánicos de como dadores de H.
- *Autótrofos*, son todos aquellos microorganismos capaces de obtener la mayor parte del carbono celular por fijación de anhídrido carbónico.
- *Heterótrofos*, los que obtienen el carbono celular de compuestos orgánicos.
- Con relación a la convivencia de microorganismos con plantas y animales superiores y con otros microorganismos podemos clasificarlos:
- *Simbiosis*, es la unión de organismos de especies distintas que viven en contacto espacial siempre que los dos miembros salgan beneficiados.
- *Comensalismo*, cuando el beneficio mutuo es menos ostensible, pero sin perjuicio para ninguno de los miembros.
- *Parasitismo*, sólo uno de los miembros sale beneficiado, el parásito, mientras que el otro, el huésped, sale perjudicado pudiendo ser eliminado. Los *parásitos facultativos* pueden crecer en ausencia del huésped; los *parásitos obligados* dependen de uno o más huéspedes, no pueden vivir fuera del huésped, de sus tejidos (parásitos tisulares) o fuera de sus células (parásitos celulares).
- *Saprotitismo*, constituye la alimentación a partir de materia orgánica muerta, es un tipo especial del tipo heterótrofo.

MÉTODOS DE CULTIVO SELECTIVO

Algunos microorganismos llaman nuestra atención porque forman agrupaciones detectables, porque forman colonias, porque forman agrupaciones destacables o porque alteran el medio.

Si éstos microorganismos aparecen de forma tan evidente pueden ser *aislados directamente*. No resulta difícil encontrar condiciones adecuadas de crecimiento. Sin embargo tenemos los **cultivos de enriquecimiento**, donde se establecen las condiciones ambientales mediante la fijación de cierto número de factores como fuentes de energía, de nitrógeno y de carbono, aceptor de hidrógeno, luz, temperatura, pH, etc.; y se inocula el medio con una población mezclada, como la que se presenta en la tierra o en el barro. En éstas condiciones se impone el mejor adaptado y su crecimiento supera al de los restantes organismos. Transfiriendo repetidas veces el cultivo a la misma solución nutritiva y extendiéndolo en un medio de cultivo sólido de la misma composición puede aislarse con facilidad la cepa enriquecida. Si se efectúa una subinoculación líquido-líquido se evita el crecimiento de los organismos acompañantes que a modo de flora secundaria utilizarían los productos de secreción de la autólisis de las células más favorecidas.

Un material de inoculación muy ventajoso lo constituye las muestras de aquellos lugares donde ya se ha producido un **enriquecimiento natural**, por ejemplo microorganismos que utilizan monóxido de carbono en las aguas residuales en las plantas de gas, microorganismos que oxidan los hidrocarburos en los campos y en los pozos.

Los cultivos de enriquecimiento permiten aislar microorganismos con una combinación cualquiera de requerimientos siempre que el tipo deseado se dé en la naturaleza. Para organismos de extrema especialización se pueden establecer condiciones especiales de enriquecimiento.

El éxito de un cultivo de enriquecimiento depende de no suministrar más de los suplementos mínimos que requiera el tipo metabólico que quiere enriquecerse.

En un mismo inoculo pueden existir distintas cepas del mismo tipo metabólico que sólo se diferencian ligeramente, por ejemplo en el pH óptimo o en la velocidad de crecimiento. Se inocula un cultivo de enriquecimiento con éste material se impone la cepa **mejor adaptada** o de crecimiento más rápido. Si se desea aislar el *mayor número posible de cepas* que crezcan en las condiciones de selección, puede utilizarse el **método directo sobre placa**. Si se extiende el inoculo en la superficie de un medio de cultivo selectivo solidificado, los tipos metabólicos favorecidos forman colonias.

FISIOLOGÍA DEL CRECIMIENTO

Crecimiento es el aumento irreversible de materia viva, que por lo general, se efectúa mediante el incremento y la división de las células.

En los organismos pluricelulares aumenta el tamaño, en los unicelulares el número, en éstos debe diferenciarse del aumento del número de células y el incremento de la masa celular.

Para determinar el número o la masa de bacterias se parte de suspensiones homogéneas de bacterias en un líquido y se determina la *concentración de bacterias* (número de células/ml) o la *densidad bacteriana* (mg/ml). A partir del incremento de estas cantidades en un cultivo de bacterias en crecimiento puede determinarse la *tasa de división* (el número de duplicaciones de la concentración de bacterias por hora) y su valor recíproco, el *tiempo de generación* (intervalo de tiempo entre dos duplicaciones).

Métodos de determinación del número de bacterias y de la masa bacteriana

Durante el crecimiento de un cultivo estático de bacterias no tienen que existir relaciones fijas entre el incremento del número de bacterias y el incremento de masa. Deben diferenciarse éstas magnitudes.

Número de bacterias

No todas las células de una población son viables. Se consideran aquellas que pueden formar colonias en agar nutritivo o que pueden formar suspensiones en un medio líquido.

I) Número total de células.

- El método más utilizado se basa en el *contaje microscópico* de las células extendidas en la película delgada de una *cámara de contaje*.
- Se puede realizar el *contaje relativo* respecto a números conocidos de pequeñas partículas.
- El *contador COULTER*, aparato electrónico que se basa en la pérdida de conductividad de una solución de electrolitos, pérdida que tiene lugar cuando la bacteria pasa por una abertura muy estrecha.
- Se utiliza el método de *filtro de membrana* cuando el número de células es pequeño (inferior a 10^6 células/ml); se filtra la solución, se seca el filtro, se tiñe y se cuenta el número de células al microscopio.

II) Número de células vivas.

Normalmente se cuenta el número de colonias que se forman a partir de células viables en las condiciones adecuadas para el crecimiento. De acuerdo con el método de siembra en placa de KOCH se mezcla una parte alícuota de una suspensión celular homogénea diluida de la forma adecuada con agar nutritivo líquido (40-50 °C) y se extiende en una cápsula de Petri.

El empleo de éste método y de métodos derivados se reduce al contaje de células de la misma especie procedente de suspensiones homogéneas y no puede ser transferido al contaje de individuos de especies distintas procedentes de poblaciones mezcladas.

Masa bacteriana

La elección del método para detectar la masa bacteriana depende del contexto al que tenga que referirse la masa bacteriana. Cuando se determina el rendimiento celular se utiliza a menudo el peso fresco (PF) o el peso seco (PS).

Para medidas relativas de actividad metabólica y enzimática se utiliza el contenido en proteína o en nitrógeno. La elección del método se realiza, a menudo, desde el punto de vista de la facilidad y la velocidad de su realización. En los procedimientos rutinarios son preferibles los métodos indirectos.

I) Métodos directos

- El peso húmedo se centrifugan las células, se las lava para eliminar restos de medio de cultivo y se pesan.
- El peso seco se determina después de centrifugar y lavar las células, secándolas hasta llegar a peso constante.
- El contenido total de nitrógeno y el contenido total de carbono pueden determinarse con mayor exactitud.
- Se determina a menudo la proteína bacteriana.

II) Métodos indirectos

Los métodos que se refieren a la posibilidad de determinar la turbidez de una suspensión celular pueden utilizarse para determinar la masa celular.

Medidas del metabolismo que dependen directamente del crecimiento (entrada de O₂, producción de CO₂ o de ácidos). Éste método responde cuando los demás pueden ser deficientes, para densidades celulares muy bajas. Se pueden utilizar para éstos, métodos tirimétricos, manométricos, electroquímicos y otros.

Crecimiento exponencial y tiempo de generación

Las bacterias se multiplican por división binaria; su multiplicación representa una progresión geométrica $2^0, 2^1, \dots, 2^n$.

Si la unidad de volumen de un cultivo estático contiene N_0 moléculas, el número de células N después de n divisiones es pues igual a:

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

Si aplicamos logaritmos es,

$$\log N = \log N_0 + n \cdot \log 2$$

Y así el número de divisiones celulares n es:

$$n = (\log N - \log N_0) / \log 2$$

de ahí resulta el número de divisiones celulares por hora, tasa de división,

$$v = n / t = (\log N - \log N_0) / \log 2 (t - t_0)$$

El tiempo necesario para un ciclo de división es el tiempo de generación,

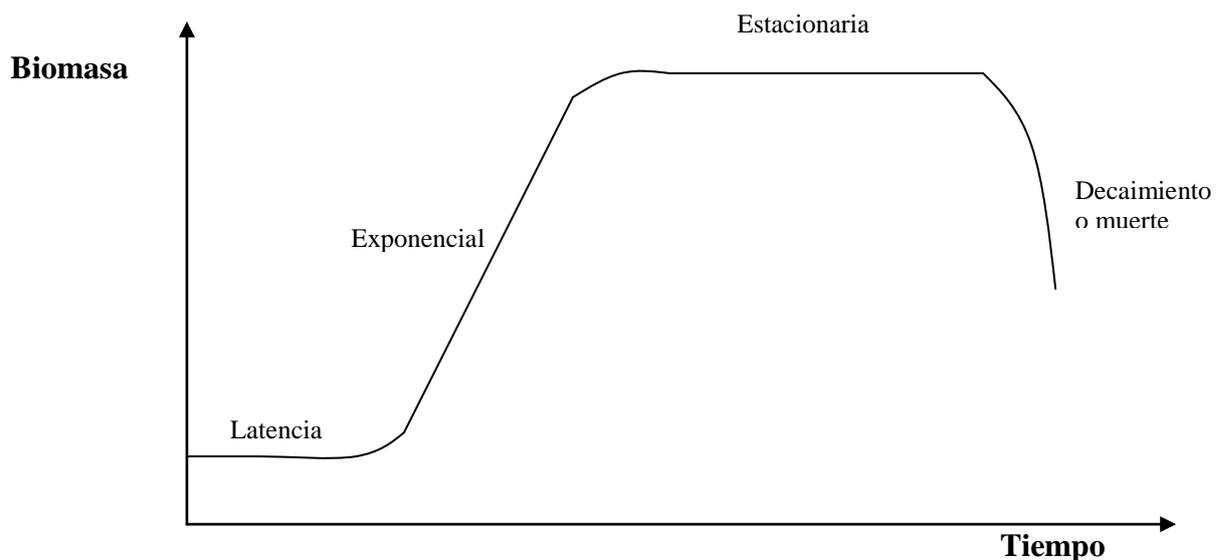
$$G = t / n = 1 / v$$

En escala semilogarítmica se expresa el número de células en ordenadas y en abscisas el tiempo en horas. De ésta manera el crecimiento exponencial queda expresado por medio de una recta, la velocidad de crecimiento está dada por la pendiente de dicha recta; a mayor pendiente, mayor es la velocidad de crecimiento.

Crecimiento bacteriano en un cultivo estático: curva de crecimiento.

Si se inocula una solución nutritiva con bacterias, éstas crecen hasta que un factor alcanza la concentración mínima y limita el crecimiento. Si durante éste proceso no se añade ninguna sustancia nutritiva al medio ni tampoco se elimina ningún producto terminal del metabolismo se dice que el crecimiento en ese espacio vital dado constituye un **cultivo estático**. Un cultivo estático se comporta como un organismo pluricelular con crecimiento limitado genéticamente.

El crecimiento de un cultivo de bacterias puede mostrarse gráficamente expresando el logaritmo del número de bacterias en función el tiempo. Podemos ver una curva de crecimiento típica tiene forma sigmoideal y permite diferenciar varias fases de crecimiento:



1- Fase de latencia, comprende el intervalo de inoculación y el momento en que se alcanza la tasa de división máxima. La duración de ésta etapa depende del cultivo previo y de la edad del inóculo así como de lo adecuado del medio.

2- La fase exponencial (logarítmica) del crecimiento se caracteriza por la constancia de la tasa de división, que es una medida específica de cada especie que depende del medio. Los tiempos de división de bacterias pueden variar entre 15 y 30 minutos como así unas 5 o 10 horas. El tamaño de la célula y el contenido de proteínas es constante durante la fase logarítmica; el cultivo está formado, en cierta manera, por células estándar. Debido a la constancia de la tasa de división ésta fase constituye el período más adecuado para determinar la tasa de división y la tasa de crecimiento. También para estudiar la influencia de los factores ambientales así como la utilización de distintos sustratos para el crecimiento de las células.

3- La fase estacionaria es aquella en que las células ya no continúan creciendo. La tasa de crecimiento depende de la concentración del sustrato; cuando se produce una disminución de

éste, se produce una disminución en la tasa de crecimiento. Al aumentar la densidad de población y la disminución de la presión parcial de oxígeno, reducen la tasa de crecimiento. La masa total de células que puede obtenerse en la fase estacionaria se denomina cosecha o rendimiento, depende de la especie y de la cantidad que se haya añadido de las distintas sustancias nutritivas así como de las condiciones de cultivo.

La **fase de muerte** está poco estudiada así como sus causas. Las causas son notables cuando se agregan ácidos.

Parámetros de la curva de crecimiento

Se sigue el crecimiento de un cultivo estático siguiendo el aumento de masa (peso seco), interesan tres magnitudes que caracterizan el crecimiento, parámetros de crecimiento.

El **Rendimiento**, es igual a la diferencia entre la masa inicial y la masa máxima: $X = X_{\max} - X_0$. Se expresa en gramos de peso seco.

La tasa de crecimiento exponencial es una medida de la velocidad con que tiene lugar el crecimiento celular durante la fase de crecimiento exponencial.

Se calcula a partir de las densidades x_t y x_0 medidas a los tiempos t_t y t_0 según:

$$\mu = (\ln x_t - \ln x_0) / (t - t_0)$$

y el tiempo de duplicación viene dado por: $t_d = \ln 2 / \mu$,

para células estándar se obtiene $\mu = \ln 2 \cdot v$ y $t_d = g$.

El **período de latencia** constituye un parámetro adecuado para determinar las propiedades del bacteria o para que el medio de cultivo resulte adecuado. El período de latencia es el intervalo de tiempo transcurrido entre el momento en el que el cultivo presentaba una densidad determinada y el momento en el que se habría alcanzado la misma densidad si el cultivo hubiese crecido exponencialmente desde que se efectuó el inóculo.

Crecimiento en cultivo continuo

En un cultivo continuo lo que se busca es mantener las condiciones del cultivo sin que cambien, ya que en un cultivo estático continuamente están alterándose, se incrementa la densidad celular y disminuye la concentración de sustrato. Es deseable, en algunos casos, mantener las células durante largos períodos de tiempo en una misma concentración. Si se transfiriesen las células a un medio nuevo varias veces separadas por intervalos cortos de tiempo casi se obtendría ésta situación. Se puede alcanzar ésta condición más fácilmente añadiendo medio de cultivo a una población bacteriana en crecimiento y sacando una cantidad igual a la suspensión bacteriana.

De ésta manera se trabaja con el quimiostato o un turbioestado.

El **quimiostato** consiste en un recipiente en el que va entrando medio con un flujo constante procedente de un depósito. Mediante la aireación y agitación mecánica se consigue que la entrada de oxígeno en el recipiente de cultivo sea óptima así como que las sustancias nutritivas presentes en la solución que va fluyendo se realice lo más rápida y regular posible. En la misma medida en que entra el medio en el recipiente de cultivo va saliendo la suspensión bacteriana.

Si la tasa de crecimiento es igual a la tasa dilución la pérdida de bacterias es igual al aumento, en éstas condiciones el cambio es nulo y la densidad celular permanece constante, alcanzando el **equilibrio dinámico**. La multiplicación exponencial de las células está compensada por un proceso exponencial negativo.

El quimiostato de cultivo está controlado por el sustrato. La estabilidad del sistema se basa en esta limitación de la tasa de crecimiento por la concentración de uno de los sustratos necesarios para el crecimiento (dador de hidrógeno, fuente de nitrógeno, de fósforo o de azufre).

El cultivo continuo en el **turbioestado** se basa en mantener constante una determinada densidad celular o turbidez. En el recipiente de cultivo todas las sustancias nutritivas están en exceso y las bacterias crecen casi con la tasa máxima de crecimiento.

El **cultivo estático** tiene que considerarse como un sistema cerrado que atraviesa en su desarrollo una fase de latencia, una fase exponencial una fase estacionaria y una fase de muerte. Las condiciones de cultivo en cada momento son distintas.

El **cultivo continuo** representa un sistema abierto que se encuentra en equilibrio dinámico. El factor tiempo está en cierto modo desconectado. Las condiciones ambientales que se ejercen sobre los organismos son siempre iguales. Es de fácil automatización.

Sincronización de la división celular

Para poder estudiar los procesos metabólicos durante el ciclo de división de las bacterias se requieren suspensiones en las que todas las células se dividan al mismo tiempo, *sincrónicamente*. La sincronización puede obtenerse alterando la temperatura, por excitación luminosa, limitando las sustancias nutritivas o tamizando las células del mismo tamaño con filtro.

Inhibición del crecimiento y destrucción

El crecimiento de los microorganismos puede ser frenado o inhibido por una serie de productos químicos, si la sustancia vuelve a su crecimiento después de que se le retiró la sustancia tóxica se denomina **bacteriostático**. Los agentes **bactericidas** causan la muerte del organismo. Existen además ciertas bacterias que toleran ciertas cantidades de venenos que luego pueden restablecer el crecimiento.

Procesos de esterilización

Es la liberación de un material de microorganismos vivos o en estado latente.. Tenemos **contaminación** cuando en un medio estéril se han introducido otros microorganismos en forma involuntaria. Los microorganismos presentan distintos grados de sensibilidad a los medios para eliminarlos, dependiendo del contenido de agua y el pH del medio, de la edad de las células, y de las diversas condiciones ambientales.

Puede esterilizarse por medio de calor húmedo (120 ° C, 20 a 30 minutos), calor seco (180 ° C o más, 30 minutos o más), filtrando (aire: 0,2 µm de diámetro de poro; agua 0,4 µm de diámetro de poro), irradiando (UV o gamma) o con medios químicos (por ejemplo: óxido de etileno).

Procesos de conservación

Los productos orgánicos están sometidos a la degradación por microorganismos si no se evita la multiplicación y acción de los microorganismos con determinados medios y condiciones.

Para la conservación se pueden aplicar métodos físicos, como secado por calor, irradiado, esterilización térmica, o métodos químicos, como acidificación natural o aplicada al medio, salado o conservación en medio azucarado seguido de esterilización por temperatura.

LOS MICROORGANISMOS Y SU AMBIENTE

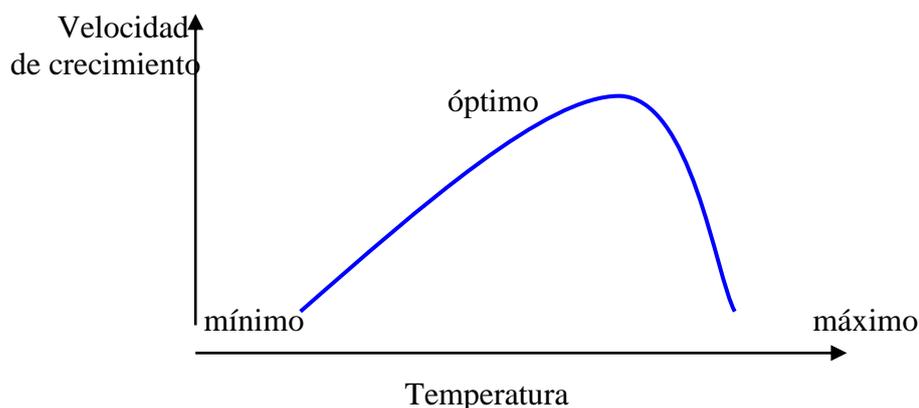
Las actividades de los microorganismos son afectadas por las condiciones físicas y químicas del medio donde se encuentran. Los organismos no pueden tolerar ciertas situaciones adversas y el conocimiento de la influencia de las condiciones del medio sobre su desarrollo nos ayudará a reconocer la distribución de los microorganismos en la naturaleza.

TEMPERATURA

Ésta es uno de los factores que más influyen en el crecimiento y el comportamiento de los microorganismos. Conforme se aumenta la temperatura en un margen dado, el crecimiento y las funciones metabólicas aumentan hasta un cierto punto en donde se producen reacciones de inactivación.

Por tanto, encontramos que para cada organismo, encontramos una *temperatura mínima* por debajo de la cual no se produce crecimiento, una *temperatura óptima* en la que se da el crecimiento más rápido, y una *temperatura máxima* por encima de la cual no es posible el crecimiento.

La temperatura del óptimo está cerca siempre del máximo que del mínimo.



Estas temperaturas, características de cada microorganismo, son denominadas temperaturas cardinales pero no están completamente fijadas ya que dependen o pueden ser modificadas por otros factores como pH y la nutrición. Las temperaturas pueden variar desde 5 a 80 °C, según la especie.

Sin embargo el rango de temperaturas de crecimiento varía en un rango más amplio, entre -12 °C y superior a 100 °C (temperatura de ebullición). Un mismo organismo no crece en todo el rango de temperaturas, sino que se desarrolla entre un margen de 30 o 40 grados.

Los organismos con márgenes de temperatura son denominados **estenotermos**, se encuentran generalmente en hábitats de temperatura constante. Los **euritermos** tienen un margen de temperatura más amplio y se encuentran en ambientes donde varía la temperatura.

Ambientes fríos

Psicrófilos o criófilos son los organismos que pueden crecer a temperaturas bajas, siendo esta temperatura de 0 °C. Existen los psicrófilos obligados y facultativos.

Los **psicrófilos obligados** tienen temperaturas óptimas de menos de 15 °C, son estenotermos. Se encuentran en ambientes que son constantemente fríos, y suelen morir rápidamente con un breve calentamiento o a una temperatura ambiente. Dentro de éste tipo encontramos algas, hongos y bacterias.

Los **psicrotolerantes** tienen temperaturas óptimas de 25 o 30 °C, pero pueden desarrollarse levemente hasta 0 °C. Tienen una distribución más amplia y pueden ser aislados de los suelos y climas templados. La temperatura es un factor que favorece a los psicrófilos facultativos y no a los obligados, muy sensibles al calor, con el que pueden ser eliminados. Varios géneros de bacterias, hongos, algas y protozoos tienen miembros facultativos.

El comportamiento de crecimiento de los psicrófilos a bajas temperaturas y muerte a temperaturas no superiores a los 40 °C, está definido por su contenido de enzimas que favorecen la catálisis a bajas temperaturas. Otra característica es que sus procesos de transporte activo son más eficientes a bajas temperaturas.

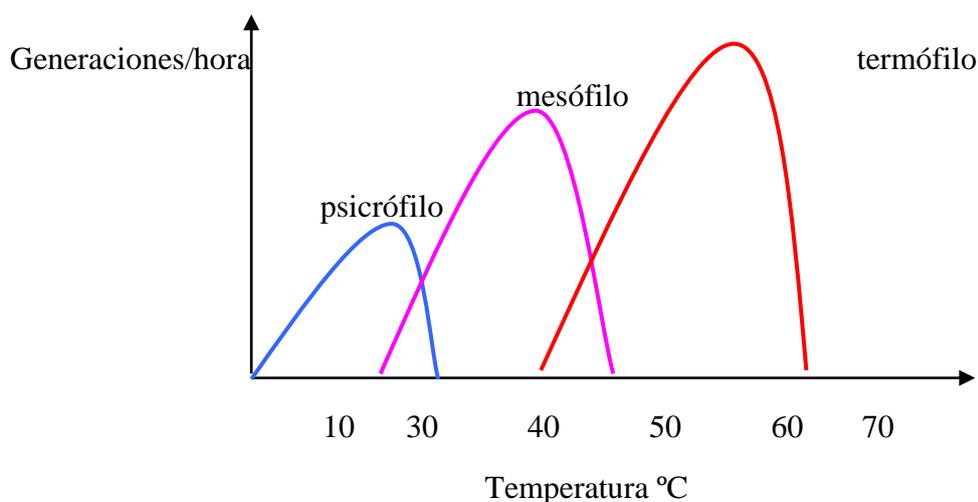
Congelación

Si bien la congelación impide el crecimiento bacteriano, no siempre produce la muerte de los microbios, ya que existen reacciones enzimáticas que pueden transcurrir lentamente a temperaturas tan bajas como -30 °C, que es donde se detiene el crecimiento celular.

En general las células grandes son mucho más sensibles a la congelación que las pequeñas, y las que no poseen paredes celulares son mucho más sensibles que las que tienen. En la congelación suelen morir algunas células cuando el cultivo es congelado, pero la célula que sobrevive a la congelación inicial puede permanecer viable en estado de congelación durante largos períodos de tiempos. Esto es un estado de vida suspendida, ya que las funciones celulares pueden ser cortadas por completo y sólo cuando se deshiela el cultivo puede comenzar de nuevo el metabolismo. Cabe destacar el daño que producen los cristales congelados sobre las estructuras celulares, principalmente sobre la membrana citoplasmática, y no produce el mismo resultado si el enfriamiento es rápido o si se da el tiempo para que se equilibren los estados de transición por los que pasa la célula al ser congelada. Cuanto más baja es la temperatura a la que se conserva el cultivo congelado tanto mejor se conserva.

Ambientes cálidos.

Mesófilos son los microorganismos cuya temperatura óptima está entre los 25 y 40 °C. Debido a que las reacciones enzimáticas se aceleran a mayores temperaturas es que los mesófilos crecen más rápido que los psicrófilos y los termófilos más rápido que los primeros cuando aumenta la temperatura a unos 60 °C.



Relación de la temperatura con las velocidades de crecimiento.

Ambientes de alta temperatura.

Los organismos que crecen a temperatura por encima de los 45 a 50 °C se denominan **termófilos**. Éstas condiciones de temperatura sólo se encuentran en regiones o zonas especiales, como algunas superficies donde da la luz directa del sol se calientan a más de 50°C; manantiales de agua caliente y otras zonas específicas como los procesos de degradación de materia orgánica tal como el compostaje.

Las bacterias termófilas tienen en la membrana lípidos ricos en ácidos grasos saturados y las psicrófilas tienen lípidos ricos en ácidos grasos no saturados que las hacen inestables a altas temperaturas.

Hay microorganismos que se desarrollan a temperaturas superiores a 75 °C. Se denominan hipertermófilos. Se encuentran en manantiales volcánicos, géiseres, solfaratas y en los respiraderos hidrotermales de las cordilleras submarinas.

Estudiando las distintas condiciones podemos decir que:

- Los organismos procariontes en general son capaces de crecer a mayores temperaturas que los eucariotes,
- Los organismos no fotosintéticos pueden desarrollarse a temperaturas más altas que las formas fotosintéticas,
- Los organismos estructuralmente menos complicados pueden crecer a mayores temperaturas que los más complejos.

EFFECTOS OSMÓTICOS Y ACTIVIDAD DEL AGUA

Todos los organismos necesitan agua para vivir. La cantidad de agua varía de acuerdo a los diferentes ambientes y a la disponibilidad de ésta; también hay que tener en cuenta los factores de absorción y de disolución. El agua absorbida a la superficie puede o no estar disponible, según la fuerza con que esté adherida y según la eficacia para recuperarla. Una manera práctica y útil para determinar la disponibilidad de agua es a través de su actividad.

Actividad del agua (a_w)

La actividad del agua está relacionada con la presión de vapor del agua contenida en el aire sobre una solución o sustancia, y se la calcula midiendo la humedad relativa de la fase vapor, que expresa la cantidad de agua presente en el aire, a una temperatura dada, en relación con la cantidad que se encontraría con el aire saturado de agua. La actividad del agua se expresa como fracción, así, 0,75 de a_w es 75 % de humedad relativa. Para medir la actividad del agua de una sustancia o solución se coloca ésta en un espacio cerrado y se deja que alcance un estado de equilibrio con el aire. La actividad del agua indica la disponibilidad de la misma.

Actividad del agua y crecimiento microbiano

En el citoplasma la concentración de solutos es mayor que en el medio de manera que el agua tiende a entrar en la célula. Si la concentración externa de soluto se eleva hasta un valor mayor que el de la interna de la célula el agua tenderá a salir de la célula, y éstas condiciones la única manera de obtener agua y crecer es aumentando la concentración interna de solutos. Algunos organismos pueden hacer esto mejor que otros, soportando crecer en lugares de actividades bajas.

Cuando un organismo crece en un medio con una actividad baja del agua debido a la adición de un soluto, debe realizar más trabajo para extraer agua de la solución. Esto da un menor rendimiento de crecimiento o una velocidad de crecimiento más baja.

Dos solutos con la misma actividad de agua pueden afectar de distinta forma a las células, uno favoreciendo el crecimiento y otro podría llegar a ser tóxico sobre las células.

Actividad matricial y osmótica del agua.

Sabemos que la actividad del agua está afectada por la adsorción o por la interacción con los solutos. **Efecto matricial** denominamos al ejercido por la adsorción del agua, porque la matriz de las sustancias o materiales que adsorben el agua es realmente la responsable de la reducción de disponibilidad de agua. **Efecto osmótico** es el efecto ejercido por los solutos sobre la actividad del agua.

Técnicamente es más fácil variar la actividad osmótica del agua que la actividad matricial, ya que para la primera sólo hay que añadir soluto a un medio de cultivo.

La variación de la actividad matricial podemos realizarla de dos maneras: la primera es secando el sustrato que se desea estudiar para eliminar toda el agua y luego se le añade el agua para que dé el nivel de actividad deseado. La cantidad de agua añadida depende de la fuerza o la capacidad de la sustancia para absorber el agua. La segunda no precisa el conocimiento de las características de ligamento del agua por parte de la sustancia, se basa en dejar que ésta se equilibre con una atmósfera de humedad relativa equivalente a la actividad hídrica deseada.

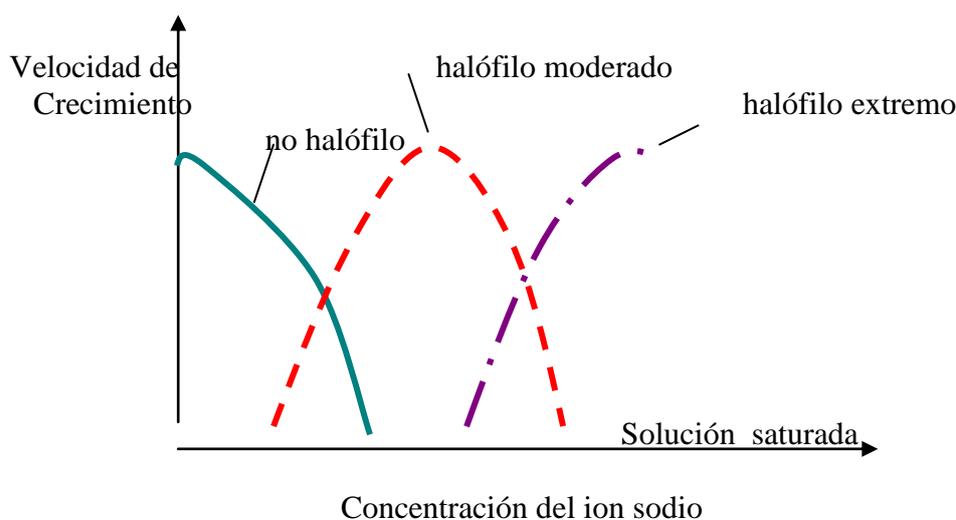
En un sistema controlado osmóticamente, el organismo puede concentrar soluto del medio, permitiendo así el movimiento del agua hacia dentro, mientras que en un sistema matricial no se hallan disponibles en el ambiente circundante grandes cantidades de soluto.

Ecología de los ambientes salinos

Desde el punto de vista ecológico los efectos osmóticos conciernen principalmente en hábitats con elevada concentración de azúcares o sales.

Los microorganismos que necesitan NaCl para su crecimiento se llaman *halófilos obligados*, tenemos halófilos que presentan distintas necesidades de concentración de sal.

Mientras los que crecen en una solución salina de NaCl pero no lo necesitan para su crecimiento se denominan *halófilos facultativos*. También se llaman halotolerantes.



De acuerdo a la concentración de NaCl los microorganismos se denominan halófilos discretos (1-6 %), halófilos moderados (6-15%). Los *halófilos extremos* son aquellos que crecen cuando la concentración de NaCl está en el rango de 15-30 %.

PRESIÓN

Los microorganismos que crecen a presión atmosférica no muestran una disminución notable de su tasa de crecimiento por variaciones de la presión atmosférica; sin embargo, cuando ésta disminuye a niveles extremadamente bajos (atmósfera superior), el agua puede evaporarse y el oxígeno se vuelve limitante.

Cuando la presión aumenta (por ejemplo en el mar a medida que se aumenta la profundidad, la presión sube aproximadamente una atmósfera cada 10 m) la actividad de los microorganismos que se desarrollan a presión atmosférica disminuye en algunos casos (microorganismos sensibles) mientras que en otros no los afecta prácticamente en el rango de 1-400 atm (equivalente a 4000 m de profundidad en el mar).

Hay microorganismos que resisten este aumento sin disminuir la actividad y se denominan barotolerantes, resisten presiones de 400 a 1000 atm (equivalente a 10000 m de profundidad).

Existen microorganismos que se denominan barófilos que no pueden crecer a bajas presiones y en general no se desarrollan a presión atmosférica. Las presiones en que se desarrollan corresponden al rango 400 a 1000 atm.

Estos datos corresponden a crecimiento a presión constante. Si se lo somete a compresión progresiva los microorganismos barófilos y barotolerantes se desarrollan sin inconvenientes, pero si se los somete a una descompresión muchos mueren, quedando sólo algunos barófilos en condiciones viables.

ACIDEZ Y pH

La acidez o alcalinidad de una solución se expresa por su valor de pH que se obtiene matemáticamente como el logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones.

El pH del agua pura es de 7, la concentración de hidrogeniones de agua pura es de 10^{-7} ; los valores menores a 7 son compuestos **ácidos** y los mayores son **alcalinos**. Tener en cuenta que el pH es una función logarítmica de base 10, por lo que una solución de pH 5 es diez veces más ácida que una de pH 6.

Para medir el pH de soluciones se usan pH-metros comerciales con electrodos de vidrio. El pH varía entre 0 y 14 (concentración de iones hidrógeno entre 10^{-0} y 10^{-14} g / litro). También se usan colorantes indicadores pero son menos exactos.

En los medios de cultivo es deseable mantener un pH relativamente constante durante el crecimiento microbiano, esto puede lograrse con sustancias reguladoras. Éstas, son ácidos o bases débiles que toman o liberan iones hidrógeno a medida que cambia la concentración de hidrogeniones del medio y de ésta forma se mantienen constante la concentración de ellos.

Crecimiento microbiano y margen de pH

Cada microorganismo tiene un margen de pH en el cual es posible su desarrollo, y tiene un pH para el cual su crecimiento es óptimo.

La mayoría de los ambientes naturales tiene un pH entre 5 y 9, y los organismos más comunes se desarrollan en éstas condiciones, unos pocos pueden desarrollarse en ambientes de pH inferior a 2 y superior a 10.

El margen en el que pueden crecer los organismos es variable, la mayoría de las bacterias tienen márgenes entre 3 o 4 puntos; los hongos y las algas eucariotas presentan un rango amplio de pH en el cual pueden crecer.

Aunque los microorganismos se encuentran en hábitats de un amplio margen de pH, el interior de la célula está probablemente cerca de la neutralidad. En un ambiente ácido, el organismo puede mantener un pH próximo al neutral no permitiendo la entrada de iones H^+ o expulsándolos a de modo activo tan rápidamente como entran. La pared celular ejerce un papel importante en no permitir la entrada de iones H^+ .

La neutralidad es importante porque en la célula existen muchos componentes sensibles a los ácidos y a los álcalis, la presencia o la incorporación de una sustancia de pH no próximo al neutral puede matar a la célula o detener su evolución.

Modificación del pH por los organismos

Los mismos organismos, a través de sus actividades, alteran el pH de sus ambientes. Por ejemplo las bacterias que fermentan la glucosa produciendo ácido láctico bajan el pH de sus ambientes, frecuentemente hasta dos unidades de pH. Las levaduras bajan el pH al excretar activamente iones H^+ .

Cuando se eleva el pH por medio de la actividad microbiana, generalmente es porque se libera amoníaco a través de la desaminación de los aminoácidos o de otros compuestos orgánicos con nitrógeno. El pH del medio ambiente se puede alterar por la retirada selectiva de sustancias del medio.

POTENCIAL DE ÓXIDORREDUCCIÓN

La base real de una reacción de oxidorreducción, donde se emplea una sustancia química aportada por compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente de energía, es la transferencia de electrones. En términos energéticos el donador de electrones es una fuente energética.

El potencial de oxidorreducción, redox (Eh), en los ambientes oxidativos tienen potenciales positivos y en los reductores los tienen negativos. Una sustancia se reduce cuando recibe electrones del donador y la otra se oxida cuando los libera.

Por ejemplo el potencial de oxidorreducción del hidrógeno es:



el del hierro:



Una sustancia de menor potencial de oxidorreducción puede donar electrones a cualquier sustancia más oxidada que ella y recibirlos de una más reducida.

El potencial redox puede mantenerse constante a diferentes valores por medio de agentes químicos. En los ambientes biológicos los potenciales bajos se mantienen por agentes reductores, como H_2S o compuestos orgánicos de sulfhidrilo (SH).

Los organismos reducen el potencial redox de su ambiente debido a sus procesos metabólicos. Ello es generalmente por el consumo de O_2 y por la producción de productos del metabolismo.

Es importante considerar el nivel de oxígeno en el cultivo ya que afecta al potencial redox y es reactante en el sistema de transporte de electrones y en la biosíntesis.

Podemos clasificar los grupos de acuerdo a las condiciones de vida teniendo en cuenta el oxígeno y el potencial redox .

Los **aerobios** obligados se encuentran en los ambientes aerobios y necesitan oxígeno porque son incapaces de generar energía por la fermentación.

El oxígeno es esencial porque es un aceptor terminal de electrones y es necesario para la biosíntesis de los esteroides y los ácidos grasos no saturados.

La eficiencia de una buena aireación nos lleva a un crecimiento bacteriano aceptable. Por ello, es que se debe proveer de métodos de aireación efectivos.

Los organismos **facultativos** obtienen energía a través de la fermentación o de la fosforilización oxidativa. No es indispensable pero crecen mejor con oxígeno.

Los microorganismos **microaerofílicos** necesitan una tensión de oxígeno muy baja.

Los **anaerobios** son los que no pueden utilizar oxígeno como aceptor de electrones. Tenemos los *aerotolerantes*, que no utilizan oxígeno pero pueden desarrollarse en presencia o ausencia de él; y los *aerófilos*, obligados o estrictos, que la presencia de oxígeno es altamente tóxica. Encontramos entre estos a las bacterias y protozoos.

Los ambientes de bajo potencial redox son ambientes anaerobios. Éstos pueden ser fangos, sedimentos de lagos, ríos, pozos de petróleo, etc.; donde el bajo potencial se debe al consumo de oxígeno, principalmente por bacterias, para su respiración.

RADIACIÓN

La radiación se refiere a aquellas fuentes de energía que son transmitidas de un lugar a otro a través del aire o del espacio exterior. Pueden consistir en partículas o en ondas electromagnéticas. La radiación particular consiste en rayos de átomos o en ondas electromagnéticas, dentro de ellas tenemos las ondas hertzianas, la luz y los rayos X.

Las ondas hertzianas no tienen efectos biológicos detectables, son las radiaciones de mayor longitud de onda.

Los rayos infrarrojos son algo más cortos; producen calor cuando son absorbidos y los rayos infrarrojos con longitudes de onda menores a 1000 nm pueden ser utilizados por las bacterias fotosintetizadoras como fuente de energía.

La porción de ondas visibles por el ojo humano (380 a 760 nm) es la principal fuente de energía para realizar la fotosíntesis de las algas.

Las radiaciones ultravioleta son aun más cortas que las anteriores, están comprendidas entre 380 y 200 nm, son perjudiciales para los organismos vivos. La principal fuente de radiación ultravioleta y visible, es el sol, si bien no todos los rayos cortos ultravioleta y los largos infrarrojos llegan a la Tierra.

Las radiaciones ionizantes tienen longitudes de onda más cortas e incluyen los rayos X, producidos principalmente por el hombre, los rayos gamma, que son similares pero son productos de la descomposición de materiales radiactivos, y los rayos cósmicos, que llegan a la Tierra desde el exterior. Éstas radiaciones ionizan el agua y otras sustancias y, en general, tienen efectos perjudiciales para el organismo.

RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (UV), éste tipo de radiación es letal para los microorganismos. Las radiaciones UV que penetran a la Tierra son las de mayores longitudes de onda, las de onda corta no llegan a la superficie terrestre.

La muerte de las células por la radiación UV es debida a su acción sobre el DNA (a 260 nm es altamente letal 9), esto es porque impide que se pueda realizar una réplica del DAN. Existen enzimas que intentan y pueden reparar el daño causado por la radiación UV, es reparada sólo cuando se la expone a la luz visible en el espectro de la luz azul, éste mecanismo es denominado fotorreactivación. Otras enzimas actúan en ausencia de luz. Por lo tanto el daño será irreparable o se producirá la muerte de la célula, cuando el daño producido por la radiación sea mayor que la actividad reparadora de la célula.

La radiación ejerce mayor efecto sobre las células húmedas que las secas, sobre las no pigmentadas que las pigmentadas, sobre las haploides o mononucleadas que las diploides o plurinucleadas.

LUZ VISIBLE. La luz visible de elevada intensidad puede causar la muerte celular, debido a un proceso denominado *fotooxidación*, en el cual la luz absorbida por los pigmentos de la célula causa la inactivación de los enzimas o de otros componentes sensibles cuando está presente el oxígeno. En ausencia de oxígeno la fotooxidación no se puede producir y la luz puede ser absorbida sin causar daño. Si se pigmentan las células se aumenta enormemente la sensibilidad a la fotooxidación, a tal punto de exponerlo a la luz visible causando la muerte, éste fenómeno se denomina *acción fotodinámica*. El papel principal de la luz visible es la energía que provee para la fotosíntesis. Interviene en un gran número de procesos que ocurren con la presencia de la luz.

RADIACIÓN IONIZANTE. Esta radiación no mata por afectar directamente a los constituyentes celulares, sino que induce indirectamente cambios al introducir en el medio radicales químicos activos (radicales libres). Éstos radicales libres pueden reaccionar con macromoléculas sensibles de la célula e inactivarlas. La radiación ionizantes puede actuar sobre todos los constituyentes celulares pero la muerte es producida por los efectos sobre el DNA. La inactivación de un gen crítico puede conducir a la muerte, mientras que la inactivación de células sueltas de proteínas no conduce a la muerte. Las radiaciones ionizantes naturales como los rayos cósmicos y las provenientes de materiales naturales radiactivos nunca tienen efectos perjudiciales sobre los organismos, probablemente porque sus niveles son demasiado bajos.

FENÓMENOS DE TRANSPORTE

REACTORES E IMPLICACIONES DE TRANSFERENCIA

Un biorreactor es una instalación en el que son tratados los materiales para facilitar las transformaciones bioquímicas por la acción de las células vivas o por componentes celulares, como enzimas. El objetivo es lograr las condiciones ambientales y de transferencia de materia y energía que maximicen las transformaciones deseada desde una substancia que se llama sustrato para obtener un producto (que puede ser extracelular o intracelular)

Luego de recibir las materias primas, un proceso biotecnológico consta de:

PRETRATAMIENTO..... hidrólisis, trituración, esterilización, etc.

BIORREACCIÓN.....transferencia de masa, transferencia de calor, bioactividad

RECUPERACIÓN.....filtración, purificación, desecación, etc.

En los reactores enzimáticos la transformación del sustrato se lleva a cabo sin el sistema de soporte vital que proporcionan las células enteras, éstos reactores emplean enzimas inmovilizadas cuando se utilizan soportes sólidos o semisólidos para atrapar o unir el catalizador, de forma que no se pierda y pueda ser reutilizado.

Virtualmente todos los biorreactores tratan con sistemas heterogéneos que implican dos o más fases. Para proporcionar las condiciones óptimas para los cambios bioquímicos que se requieren , debe existir transferencia de masa, de calor y de cantidad de movimiento en la interfase.

Etapas que controlan la velocidad

Ocho resistencias son posibles en la vía de transferencia de masa, para el suministro y utilización de nutrientes y para la secreción y eliminación de metabolitos:

- la película gaseosa
- en la interfase gas – líquido
- en la película que rodea al gas
- en la masa líquida
- en la película líquida que rodea al sólido
- en la interfase líquido – sólido
- en la fase sólida que contiene o que es la célula
- en los sitios de las reacciones bioquímicas

debe notarse que todos éstos obstáculos son puramente físicos, excepto el último que puede tener sus propias complejidades biológicas.

La fase continua puede ser líquida o sólida, mientras que la fase dispersa puede ser sólida, líquida o gaseosa.

Generalmente en los biorreactores la fase líquida acuosa es quien controla la velocidad:

Resistencia **interparticular**, interfase gas – líquido y resistencia de la fase líquida en la mas del medio acuoso que separa las fases dispersas.

Resistencias **intraparticulares**, cerca de la interfase sólido – líquido (puede ser significativa por la diferencia de densidad entre el medio acuoso y continuo), una resistencia del la fase líquida dentro de la sólida dispersa.

Coefficiente de transferencia de masa

Un coeficiente de transferencia de masa relaciona las velocidades de transferencia con los términos de concentración y puede ser definido mediante un balance de masa para un reactivo o producto determinado en el biorreactor .

Podemos definir que la velocidad de transferencia de masa (N_a), de un gas a un líquido esta dada por:

$$N_a = k_L a (C_g^* - C_L)$$

Donde:

C_L : concentración del gas disuelto en la masa líquida en cualquier momento t

C_g^* : concentración del gas en la interfase gas – líquido a tiempo infinito

k_L : coeficiente de transferencia local de masa de la fase líquida

a : área de la interfase

podemos notar que la fuerza impulsora de la transferencia de masa está dado por la diferencia de concentración que está afectada por las presiones parciales (ley de Henry).

Difusión

La ley de difusión de Fick constituye la base de las teorías normales sobre transferencia de masa. Todas postulan para la transferencia entre las fases la existencia de una película de fluido laminar o estático en los límites de la fase y conducen a relaciones con el coeficiente de difusión molecular, D_L .

Para un medio, estancado (como en el interior de un agregado multicelular) o para una película estancada de flujo laminar externo estático en la superficie de una partícula, se puede demostrar que:

$$k_L \propto D_L$$

los valores de D_L para sistemas líquidos binarios caen generalmente en el rango de $0,5$ a $0,2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para solutos de bajo peso molecular en líquidos no viscosos. El oxígeno tiene un valor de D_L de $2,10 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 25°C en agua.

Realmente el comportamiento observado para casos donde no se puede aplicar la ley de Fick por no existir un equilibrio de difusión, se trabaja con:

$$k_L \propto D_L^n$$

donde n varia entre 0,5 y 1,0 de acuerdo con las condiciones hidrodinámicas.

Efectos de los fenómenos en la interfase

Si consideramos una partícula de fluido que se mueve en relación a una fase líquida continua, existen dos posibilidades extremas en la interfase:

a) no existe circulación interna de la partícula; la partícula se comporta esencialmente como si fuera sólida con superficies rígidas, *partículas con superficies rígidas*.

b) existe un flujo de circulación plenamente desarrollado en el interior de la partícula, debido a una velocidad en la interfase. La partícula se comporta como una fase continua no viscosa con solamente una diferencia de densidad, *partículas con superficies móviles*.

Al aumentar la velocidad relativa de las partículas mediante *agitación*, por ejemplo entre gas y líquido, se acelera notablemente la transferencia de masa de las fases.

Debido a la compleja hidrodinámica que se encuentra en los sistemas multifase, es útil a los problemas de transferencia física en un biorreactor el uso del análisis dimensional; en soluciones sencillas podemos recurrir a expresar las soluciones en términos de grupos adimensionales, como los números adimensionales de Sherwood, Schmidt, Grashof, Reynolds y otros).

En el caso que sea deseable trabajar con organismos anaeróbicos, se purga todo el reactor haciendo pasar nitrógeno arrastrando el oxígeno que se encuentre en el reactor.

Partículas en movimiento con superficies sólidas; un conjunto de éstos casos puede encontrarse en los lechos empaquetados, los lechos goteantes, o los sistemas reactores de fase dispersa de ascensión o de caída libre.

En las partículas con superficies fluidas móviles, por interacción viscosa con la fase fluida, se producen variaciones oscilantes de las gotas líquidas y de las burbujas gaseosas, interviniendo en la velocidad de transferencia de masa. En dispersiones fluido-fluido, las altas intensidades de agitación que facilitan la turbulencia local conducirán a la ruptura de las partículas más que a aumentar los coeficientes de transferencia de masa.

Biorreacción intraparticular

En algunos sistemas bioquímicos la capa limitante de la transferencia de masa se encuentra no en la interfase gas – líquido o sólido – líquido, sino en el interior de la partícula sólida.

Los balances de masa para estas situaciones pueden ser establecidos para casos específicos en los que pueden ser identificadas como un factor la resistencia a la transferencia de masa dentro de la partícula. En ausencia de efectos de difusión física, prevalecerán las cinéticas de las reacciones biológicas intrínsecas.

Transferencia de oxígeno en agregados de micelio de hongos

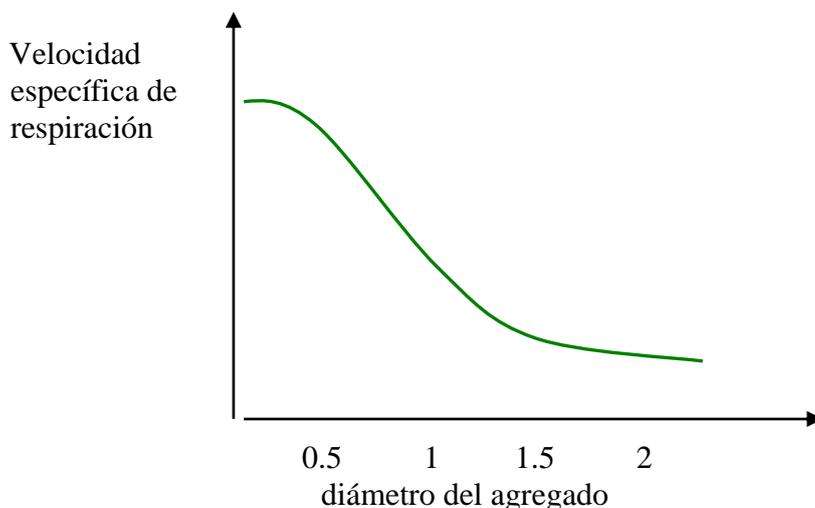
El micelio de los hongos que crecen en tanques agitados frecuentemente modifican su morfología de forma que la partícula real puede variar entre una colonia enmarañada muy abierta y un agregado de micelio (pellet) muy denso. La importancia práctica es que en un extremo la colonia abierta confiere mayor homogeneidad a la fisiología de la biomasa, pero a costa de viscosidades muy altas de la masa, mientras que el hábito de formar agregados permite concentraciones altas de biomasa a viscosidades relativamente más bajas, pero al costo de una diferenciación fisiológica considerable entre diferentes zonas del agregado.

El efecto de la difusión intraparticular sobre la velocidad de la reacción en los agregados microbianos o en los catalizadores puede ser descrita utilizando un factor de efectividad:

E_f = velocidad total de toma de sustrato / velocidad de toma de sustrato en la superficie del agregado

El factor de efectividad depende de las propiedades del organismo o de los materiales y del orden de la reacción (entre cero y uno) para la toma de sustrato.

Una solución típica para el balance de material sobre un agregado utilizando el factor de efectividad se da en la siguiente figura:



transferencia de oxígeno en agregados miceliares

Sistemas de enzimas y o microorganismos inmovilizadas

Las enzimas inmovilizadas y los microorganismos inmovilizados son sistemas en donde los agentes biológicos están situados o encapsulados en una matriz sólida que proporciona protección mecánica y ambiental y actúa impidiendo su migración o arrastre fuera del reactor, además de permitir una mayor estabilidad química a las enzimas. Se usan como agentes inmovilizantes geles que forman partículas o pellets al incorporar los microorganismos o enzimas solubilizados con uno de los agentes gelificantes en una solución de hidróxido de calcio que produce la reacción entre el gelificante (por ejemplo alginato) y el calcio.

En éstos sistemas deben difundir dentro de la matriz soporte para alcanzar la enzima. En reacciones enzimáticas rápidas, las limitaciones difusionales conducirán a perfiles de concentración en la partícula inmovilizada como se indica en la figura anterior para el agregado de hongos. En la dirección opuesta se establecerá un gradiente de concentración para los productos de reacción que sufran de similares velocidades de baja difusión. Esto puede conducir a la inhibición por producto; la acumulación de los productos cerca de los sitios de reacción reducirá la velocidad de reacción. Correspondientemente si la velocidad de reacción, más que la difusión, es limitante, puede producirse la inhibición por sustrato.

Degradación enzimática de sustratos insolubles

Cuando el sustrato en un biorreactor es insoluble (glucosa, aceites), el efecto de la transferencia de masa al interior de la partícula puede ser importante. En estos sistemas, las enzimas extracelulares rompen los sustratos a componentes solubles en agua que aparecen como productos finales o como intermediarios para ser consumidos por los microorganismos. Si un sustrato sólido es suficientemente poroso, la enzima puede difundir a su interior y la degradación puede llevarse a cabo en el interior del material.