

Biotecnología

Tema 1- Introducción. El mundo de los seres vivos. Microorganismos

- A- Áreas de la biotecnología: Ciencia e Industria. La industria biotecnológica: pasado, presente y futuro. Aspectos generales de los procesos de fermentación.
- B- Introducción al mundo de los seres vivos. Características comunes a todos los sistemas biológicos: origen, propiedades fundamentales, tipos de organización celular, modos de división celular.
- C- Divisiones del mundo viviente. Los microorganismos en el proceso de la Evolución. Mineralización y desmineralización. Ciclos de la materia: del carbono, del nitrógeno, del azufre, del fósforo. Aplicaciones.
- D- Organización interna de la célula. La célula eucariota: componentes. La célula procariota: componentes. Reproducción celular.
- E- Taxonomía microbiana: descripción y divisiones. Hongos. Levaduras. Bacterias. Algas. Estudio microscópico de los microorganismos, coloraciones. Virus y Agentes infecciosos no convencionales

Definición.

La biotecnología es la rama de la ciencia e ingeniería que utiliza seres vivos, partes de seres vivos o sus productos para obtener una serie de productos que van desde alimentos hasta medicamentos. Se logra mediante la interacción de Ingeniería, Biología y Química.

Hay varias definiciones para la misma:

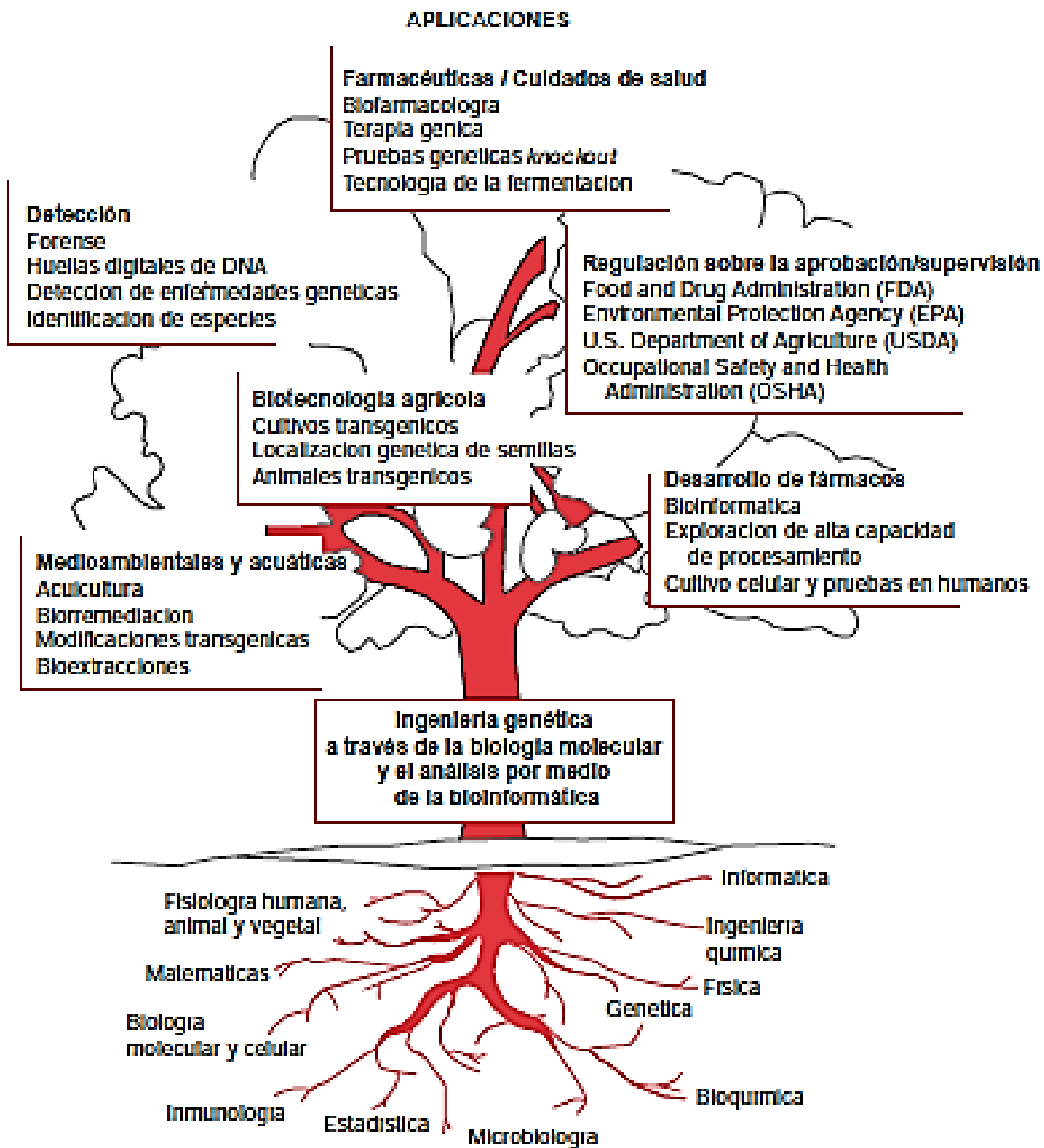
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE): la aplicación de los principios de la ciencia y la ingeniería al tratamiento de materias por agentes biológicos en la producción de bienes y servicios (1982).
- Oficina de Evaluación Tecnológica (OTA, Office of Technology Assessment): biotecnología, en un sentido amplio, incluye cualquier técnica que utilice organismos vivos (o parte de ellos) para obtener o modificar productos, mejorar plantas y animales, o desarrollar microorganismos para usos específicos (1984).
- Federación Europea de Biotecnología (EFB, European Federation of Biotechnology): uso integrado de la bioquímica, la microbiología y la ingeniería genética para poder aplicar las capacidades de microorganismos, células cultivadas animales o vegetales o parte de los mismos en la industria, en la salud y en los procesos relacionados con el medioambiente (1988).
- E. H. Houwink: el uso controlado de la información biológica (1989).
- Organización de la Industria Biotecnológica (BIO, Biotechnology Industry Organization): en un sentido amplio, biotecnología es “bio” + “tecnología”, es decir, el uso de procesos biológicos para resolver problemas o hacer productos útiles (2003).

Así y todo, la biotecnología suscita opiniones y sentimientos encontrados. Mientras algunos sectores la perciben como una tecnología basada en un sólido conocimiento científico, para otros se trata de una actividad antinatural y peligrosa. El enfrentamiento de partidarios y opositores ocurre con menos frecuencia en el terreno de las razones que en el de las pasiones, sean estas políticas, religiosas o ideológicas. Al discutir si la biotecnología es progresista o reaccionaria, buena o mala, se olvida que lo que caracteriza a una tecnología es el uso que hacemos de ella.

Las reacciones y procesos de base biológica han existido desde que la humanidad ha estado cultivando y procesando alimentos (es decir, alimentos fermentados); sin embargo, solo ha sido desde la segunda mitad del siglo XX que los procesos comerciales a gran escala para productos no alimentarios han crecido a escalas significativas (es decir, etanol para combustible). Los bioprocesos utilizan organismos vivos y materiales biológicos derivados de ellos, como enzimas, para producir medicamentos, vacunas, alimentos, bebidas, combustibles, productos químicos, polímeros y otros materiales únicos. Las complejas propiedades fisicoquímicas y la sensibilidad a las condiciones de proceso de las células y enzimas utilizadas para llevar a cabo biorreacciones requieren tecnologías y controles específicos que diferencien el bioprocesamiento del procesamiento químico más tradicional.

Al igual que con la mayoría de las tecnologías nuevas, complejas y/o costosas, las aplicaciones comerciales iniciales se centraron en productos de bajo volumen y alto valor, como los productos biofarmacéuticos humanos. Un ejemplo temprano es el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, un trastorno genético causado por una deficiencia enzimática. El primer tratamiento fue la glucocerebrosidasa, una enzima purificada de tejido humano y luego modificada enzimáticamente. Dichos tratamientos, conocidos como biofarmacéuticos o bioterapéuticos, son efectivos porque tienen estructuras complejas y modos de interacción con objetivos de enfermedades que no pueden ser igualados por productos farmacéuticos de moléculas pequeñas. Esta complejidad también es lo que los hace difíciles de desarrollar y producir, lo que da como resultado tratamientos que pueden costar más de cientos de miles de dólares por año. Después del primer tratamiento para la enfermedad de Gaucher, se desarrollaron células de ingeniería recombinante para producir versiones no derivadas de humanos del producto biofarmacéutico original. Esto eliminó las preocupaciones de seguridad relacionadas con la recolección de enzimas del tejido humano y también dio como resultado una cadena de suministro más sólida y predecible para garantizar que el tratamiento esté disponible para los pacientes.

A medida que las ciencias biológicas y de procesos fundamentales y aplicadas han avanzado, en algunos casos con grandes saltos, ha surgido y continúa surgiendo la producción comercial de productos de menor valor y mayor volumen. En un intento de categorizar esta evolución, la producción de bioterapéuticos ha sido denominada primera ola de la biotecnología moderna; la ingeniería genética de la agricultura, principalmente para la alimentación, se ha llamado la Segunda ola; y la producción de productos para usos no relacionados con la salud es la tercera ola. Esta tercera ola también ha sido llamada biotecnología industrial. La primera ola estuvo motivada por la necesidad humana y tuvo que lograr requisitos estrictos de calidad y seguridad del producto, mientras que esta tercera ola, o biotecnología industrial, está impulsada casi exclusivamente por los costos. Esto incluye productos tradicionales como etanol, antibióticos a granel para animales, aminoácidos y enzimas industriales.



Árbol de la biotecnología: disciplinas que contribuyen en la biotecnología

Las ciencias básicas son los fundamentos o «raíces» de todos los aspectos de la biotecnología. El enfoque central o el «tronco» de la mayoría de las aplicaciones biotecnológicas es la ingeniería genética. Las ramas del árbol representan diferentes organismos, tecnologías y aplicaciones que «brotan» de la ingeniería genética y la bioinformática, aspectos básicos de la mayoría de los acercamientos biotecnológicos. La regulación de la biotecnología depende de las agencias gubernamentales de cada país como la FDA, USDA, EPA y OSHA en EEUU, SENASA y ANMAT en Argentina entre otras.

Tabla 1. Ejemplos de productos obtenidos por la biotecnología

<i>Sector</i>	<i>Tipos de productos o servicios</i>
Energía	Etanol, biogás y otros combustibles (a partir de biomasa).
Industria	Butanol, acetona, glicerol, ácidos, vitaminas, etcétera. Numerosas enzimas para otras industrias (textil, detergentes, etcétera).
Medioambiente	Recuperación de petróleo, biorremediación (tratamiento de aguas residuales y de basura, eliminación de contaminantes).
Agricultura	Abono, silaje, bioinsecticidas, biofertilizantes, plantines libres de enfermedades, plantines de árboles para reforestación. Plantas con nuevas características incorporadas (transgénicas) para mayor valor nutritivo, resistencia a plagas y a condiciones de cultivo adversas (sequía, salinidad, etcétera).
Pecuaria	Embriones, animales con características nuevas (transgénicos), vacunas y medicamentos para uso veterinario, hormonas.
Alimentación	Panificación (panes y bizcochos), lácteos (quesos, yogures y otras bebidas lácteas), bebidas (cervezas, vinos y bebidas destiladas) y aditivos diversos (salsa de soja, glutamato de sodio, edulcorantes, etc.); proteína unicelular (PUC) para raciones, alimentos de origen transgénico con propiedades nuevas.
Salud	Antibióticos y medicamentos para diversas enfermedades, hormonas, vacunas, reactivos y pruebas de diagnóstico, etcétera.

Como se puede ver de esta tabla el alcance de la biotecnología es muy amplio. Para el caso de este curso se va a limitar a la parte industrial, sin dejar de lado el conocimiento necesario para conocer y controlar los agentes biológicos que actúan a modo de unidades de procesamiento en donde un reactivo es transformado a través de reacciones bioquímicas en un producto.

Historia

Las aplicaciones de los microorganismos datan de tiempo inmemorial. El hombre hizo uso de ellos sin saber que éstos existían desde que inventó o descubrió al azar la manera de hacer cerveza, vinagre, vino o pan. La cerveza era conocida antes del 6000 a.C. por sumerios y babilonios, y en el antiguo Egipto existía ya verdadera producción en 1700 a.C.; el vinagre se producía desde antes de esa fecha

y el vino es también muy antiguo, ya que existe evidencia de su producción antes del 2000 a.C. en Egipto y China y en Armenia y Turquía antes del 6000 a.C, y finalmente el pan se conoce desde 4000 a.C. aproximadamente. Algunos antropólogos e historiadores teorizan que el hombre desarrolló la agricultura no tanto para tener alimentos sino para disponer de una fuente confiable de cereales para elaborar cerveza.

Se puede afirmar que hasta comienzos del siglo XX existe muy poco o ningún control de los procedimientos utilizados para la elaboración de esos productos o alimentos. En un análisis cronológico se pueden fijar 4 grandes etapas en el desarrollo de la biotecnología industrial:

- 1) hasta 1900;
- 2) 1900-1945;
- 3) 1945-1979 y
- 4) 1979 hasta el presente, y considerar el comienzo del siglo como el inicio de cierto control en los procesos de utilización de cultivos puros.

A partir de 1900 comienza la etapa de producción de una serie de productos nuevos que se suman a los conocidos desde la más remota antigüedad, y que son la levadura de cerveza, glicerol, ácido láctico, acetona butanol y etanol. Hasta el 1945 poco se esperaba del futuro de la Microbiología Industrial, ya que solamente unos pocos productos eran fabricados con microorganismos, y además varios de esos productos podían obtenerse por otras vías, ya más convenientes por razones económicas, como etanol, ácido láctico o acetona butanol.

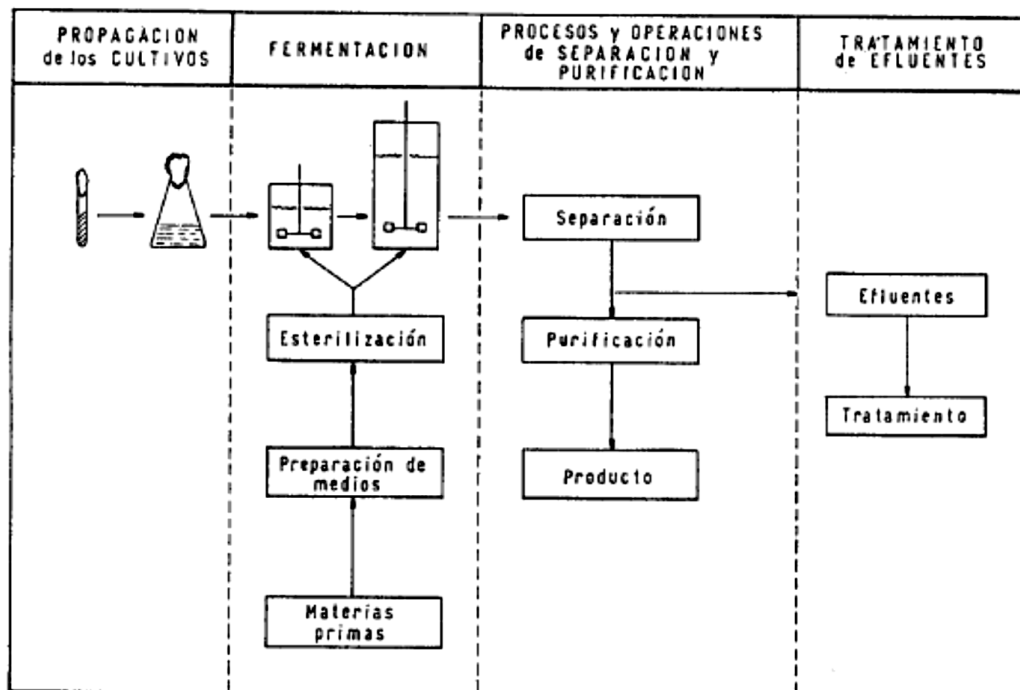
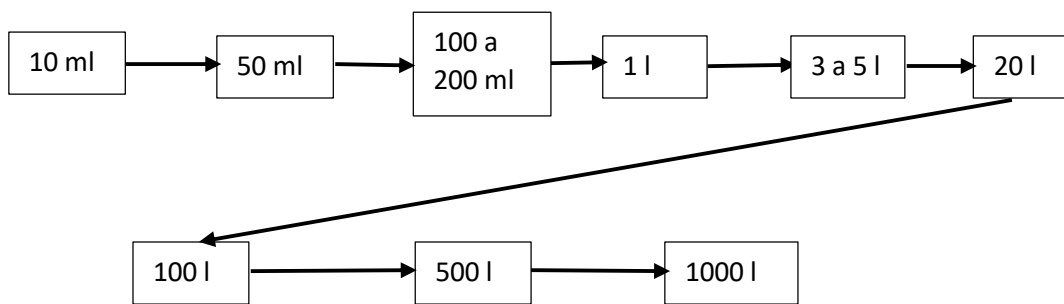
Con el advenimiento de la penicilina en 1945 y la necesidad de su producción, se produce un impacto formidable sobre los procedimientos microbiológicos, ya que se plantea el desafío de la producción en gran escala en condiciones de mucho mayor control y con necesidad de operaciones más complejas para la separación y purificación de los productos. Como consecuencia de los avances logrados en esos desarrollos se produce en pocos años la aparición de un gran número de nuevos productos, como otros antibióticos, aminoácidos, esteroides, enzimas, biomasa aplicada a la alimentación animal y humana (proteínas unicelulares), nucleótidos, etc.

A partir de 1979 la biotecnología industrial recibe un nuevo y notable impulso que se suma al anterior cuando se concretan a nivel de procedimientos prácticos las posibilidades que ofrece la ingeniería genética, disciplina surgida como consecuencia del avance de la Biología Molecular. Este nuevo impulso posibilita la producción industrial, basada en la utilización de microorganismos recombinantes, de sustancias nuevas nunca producidas antes por esa vía como la insulina, hormona de crecimiento, interferón y otras de muy reciente aparición en el mercado de productos relacionados con el área de la salud.

Proceso general de obtención de un producto por biotecnología industrial.

En los bioprocesos se utilizan mayoritariamente microorganismos o enzimas. Los microorganismos son seres vivos que realizan una serie de transformaciones complejas que son bastante difíciles de lograr por procedimientos químicos. Las enzimas son productos del metabolismo de los microorganismos y son catalizadores biológicos de estructura molecular muy compleja. Para el uso de microorganismos primero hay que disponer del mismo purificado y que sea una única especie. Una vez que se aisló y se verificó la eficiencia del mismo en la producción hay que pasar por una serie de etapas:

- 1) Producción de preinóculo: es el procedimiento en que se parte de un cultivo de conservación del microorganismo que puede ser de unos pocos mililitros y se coloca en un medio de cultivo de mayor volumen en el cual los mismos se reproducen aumentando su número o concentración para disponer de una biomasa (masa de microorganismos) suficientemente grande para pasar a una segunda etapa de crecimiento
- 2) En la segunda etapa el volumen es del orden de 10 a 20 veces la primera etapa y recibe los microorganismos obtenidos de la primera etapa. La segunda etapa recibe el nombre de producción de inóculo. Una vez que se obtuvo un volumen adecuado se procede a pasar a la escala industrial.
- 3) Los volúmenes de cada etapa varían de acuerdo al volumen del reactor final de producción y puede haber varias. Normalmente los volúmenes son:



- 4) Este proceso requiere además acciones auxiliares para mantener la calidad del cultivo microbiano evitando que se contamine con otros microorganismos que podría competir con el de interés produciendo otras sustancias perjudiciales para el proceso, por ello se debe esterilizar cada etapa

- 5) Una vez obtenido el producto en la concentración de proceso máxima hay que separarlo y el método dependerá si el producto se encuentra dentro de la célula, es la célula o está fuera de esta.
- 6) Además hay una última etapa que es el tratamiento de efluentes.

LA CÉLULA COMO UNIDAD DE LOS SERES VIVOS

Unidad estructural

La célula es la unidad estructural de los seres vivos. Sean bacterias, amebas, espermatozoides o neuronas, las células están formadas por agua, iones inorgánicos y moléculas orgánicas (proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos). Todas ellas presentan una membrana plasmática que separa al citoplasma del medio externo y permite el intercambio de moléculas entre ambos.

Las células procariotas se encuentran exclusivamente en el Reino Monera. Pequeñas (0,001 a 0,005 mm) y con requerimientos nutricionales simples, estas células se multiplican rápidamente. La información genética se encuentra en un cromosoma circular, formado por una molécula de ADN y asociado a una invaginación de la membrana plasmática (mesosoma).

También se pueden encontrar pequeñas moléculas circulares adicionales (plásmidos). Hay numerosos ribosomas que aseguran la síntesis proteica

La estructura de las células eucariotas es mucho más compleja, y se las encuentra en los cuatro reinos restantes (Protista, Fungi, Plantae y Animalia). Con un tamaño que varía entre 0,01 y 0,10 mm, estas células son diez veces más grandes que las procariotas. La presencia de compartimientos diferenciados (organelas) que cumplen actividades específicas resulta en una subdivisión del trabajo, que garantiza la eficiencia del funcionamiento de la célula (Figura 1, B y C).

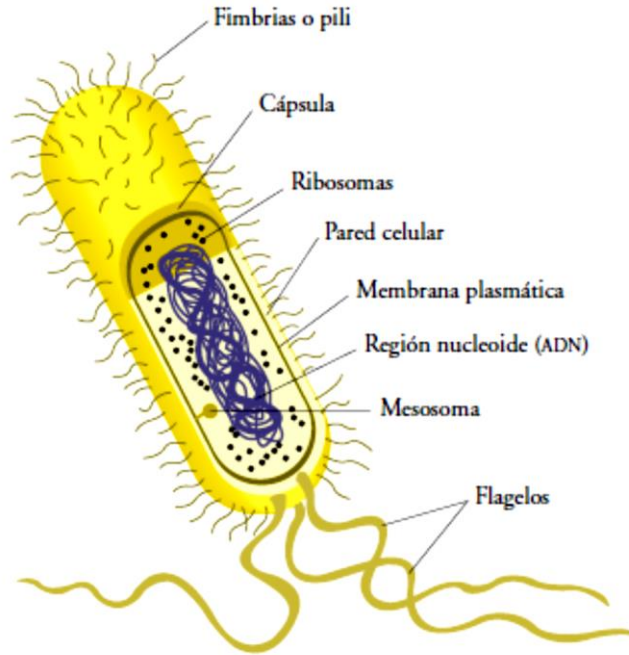
El citoplasma es atravesado por un sistema de membranas, el retículo endoplasmático, que a su vez está asociado a los ribosomas y, por consiguiente, a la síntesis de proteínas. Los productos celulares son procesados en el aparato de Golgi y luego secretados o distribuidos en otras estructuras (lisosomas, membrana celular). Hay organelas citoplasmáticas complejas y rodeadas de membranas, como las mitocondrias, los cloroplastos y los peroxisomas, que están asociadas al metabolismo energético. El citoesqueleto, formado por túbulos y filamentos proteicos, mantiene la forma de la célula, además de asegurar el transporte interno de las organelas y de los movimientos celulares.

La información genética está distribuida en cromosomas, cada uno de ellos formado por una molécula lineal de ADN asociada a proteínas. Los cromosomas y el nucleolo se encuentran en el núcleo, que funciona como un centro de control celular. La membrana nuclear, un envoltorio con poros que separa al núcleo del citoplasma, permite el intercambio de sustancias entre ambos.

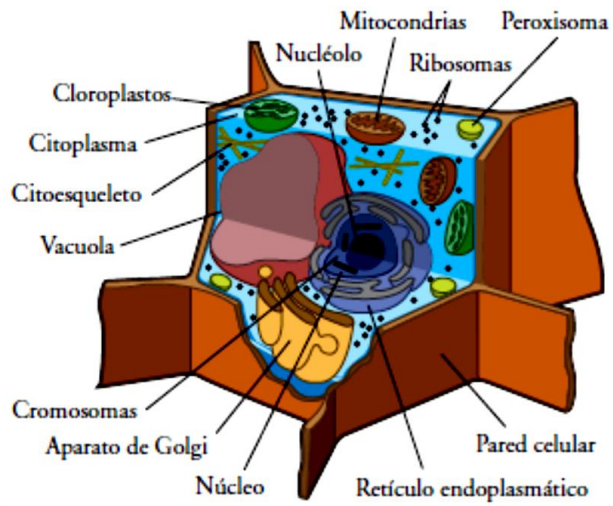
A pesar de tener una organización muy parecida, las células animales difieren de las células vegetales en algunos aspectos. En las células vegetales encontramos una pared celular alrededor de la membrana plasmática; el citoplasma contiene cloroplastos, donde ocurre la fotosíntesis, y grandes vacuolas donde se almacenan sustancias y degradan macromoléculas. Ninguna de estas estructuras se observan en las células animales; estas tienen un centriolo que falta en las células vegetales (Tabla 1).

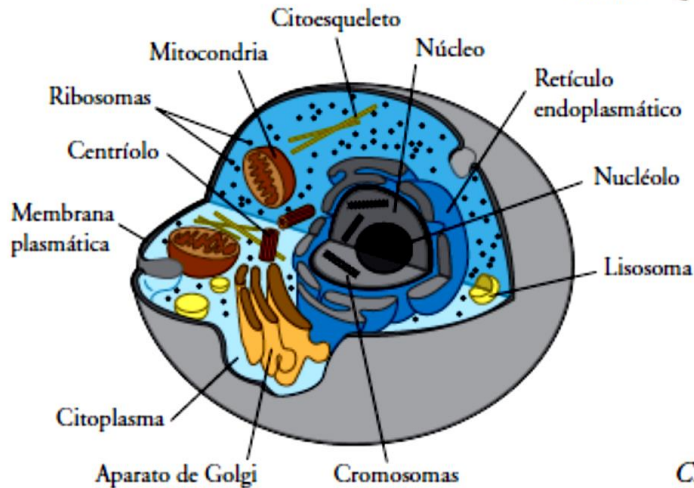
FIGURA 1. Representaciones esquemáticas de la estructura celular

A. *Célula bacteriana (procarionta)*



B. *Célula vegetal (eucariota)*





C. Célula animal (eucariota)

Unidad funcional

La célula es también la unidad funcional de un organismo. En la solución viscosa del citoplasma ocurren continuamente reacciones de síntesis y degradación de sustancias, que consumen o liberan energía. Estas reacciones constituyen lo que denominamos metabolismo.

Las reacciones metabólicas son facilitadas por proteínas con actividad catalítica, denominadas enzimas. Como las proteínas estructurales, las enzimas se sintetizan en los ribosomas, que son pequeños componentes citoplasmáticos, no membranosos. La estructura de las proteínas depende de la información genética codificada en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y transcrita en el ácido ribonucleico (ARN) que la lleva del núcleo hasta el citoplasma.

Las semejanzas estructurales y funcionales de las células provienen de un origen evolutivo común, aproximadamente 3,8 millones de años atrás. Los dos tipos celulares que reconocemos hoy, las células procariotas y las eucariotas, aparecieron entre un millón y 1,5 millones de años más tarde.

<i>Estructura</i>	<i>Función</i>	<i>Célula bacteriana</i>	<i>Célula animal</i>	<i>Célula vegetal</i>
Pared celular	Mantenimiento de la forma y protección de la célula	Presente o ausente	Ausente	Presente
Membrana plasmática	Mantenimiento de la estabilidad del medio intracelular; control del intercambio entre la célula y el medio extracelular	Presente	Presente	
Carioteca o membrana celular	Control del flujo de sustancias membrana nuclear entre el núcleo y el citoplasma	Ausente	Presente	
Cromosoma(s)	Control de la estructura y función celular	Único y circular; solo ADN	Múltiples y lineales; ADN y proteínas	
Nucléolo(s)	Formación de ribosomas	Ausente	Presente	

Centríolos	Formación de cilias y flagelos; participación en la división celular	Ausentes	Presentes	Ausentes
Ribosomas	Síntesis de proteínas	Presentes		
Retículo endoplasmático rugoso	Síntesis de proteínas	Ausente	Presente	
Retículo endoplasmático liso	Síntesis de lípidos; almacenamiento e inactivación de sustancias			
Complejo de Golgi	Secreción celular			
Vacuola central	Equilibrio osmótico y almacenamiento	Ausente		Presente
Lisosomas	Digestión intracelular	Ausentes	Presentes	Ausentes
Mitocondrias	Respiración celular aerobia	Ausentes	Presentes	
Cloroplastos	Fotosíntesis	Ausentes		Presentes
Citoesqueleto	Mantenimiento de la forma celular; contracción; anclaje de organelas	Ausente	Presente	

2. TÉCNICAS DE LABORATORIO

El estudio de las células se ve facilitado por un conjunto de técnicas de laboratorio a las que nos referimos a continuación.

Técnicas de microscopía que permiten una visualización detallada de la célula.

- Microscopía óptica, que se utiliza para observar cortes de tejidos. Generalmente, estos se fijan (con alcohol, ácido acético, formaldehído) y tiñen con colorantes que reaccionan con las proteínas o con los ácidos nucleicos, aumentando el contraste de la imagen.
- Microscopía de contraste de fase, que transforma las diferencias de grosor o la densidad del fragmento observado en diferencias de contraste.
- Microscopía de fluorescencia, que asocia anticuerpos específicos a un reactivo como la GFP (proteína verde fluorescente de medusa), para marcar las moléculas y visualizar su distribución en las células.
- Microscopía confocal, que combina la microscopía de fluorescencia con el análisis electrónico de la imagen, brindando una imagen tridimensional.
- Microscopía electrónica, que permite la observación en un plano de cortes teñidos con sales de metales pesados (microscopía de transmisión) y la observación tridimensional de las células (microscopía de barrido).

Técnicas físicas como la centrifugación diferencial (ultracentrifugación, centrifugación en gradiente) que permiten separar los componentes celulares para estudios bioquímicos posteriores.

Técnicas instrumentales que posibilitan el conteo de células y la separación de poblaciones celulares (cell sorter) o de cromosomas (flow sorter).

Técnicas de cultivo de células, con diversos objetivos.

1. LA DIVERSIDAD MICROBIANA

El término “microorganismos” se aplica a un grupo heterogéneo de seres que viven como células independientes o como agregados celulares: bacterias, protozoarios, algas, hongos y, también, virus. Encontramos microorganismos en los tres dominios de la clasificación de los seres vivos (Bacteria, Archaea y Eukarya). La excepción son los virus, en la frontera entre lo vivo y lo no vivo.

Los microorganismos muestran una diversidad sorprendente de estructura y modos de vida (Tabla 1). Algunos son procariontes, como las bacterias; otros son eucariontes, como los protozoarios, las algas y los hongos.

Las formas libres colonizan todos los ambientes terrestres, desde la cima de las montañas hasta las profundidades de los océanos. Los parásitos crecen a costa de otros seres vivos y dependen enteramente de ellos para su abrigo y alimento. Otros, en cambio, solo dependen parcialmente y en diversos grados de otros organismos vivos.

Los aerobios crecen si hay oxígeno, los anaerobios si no lo hay. Los autótrofos sintetizan sus alimentos a partir de dióxido de carbono; los fotosintéticos utilizan la luz como fuente de energía y los quimiosintéticos usan algunas reacciones químicas inorgánicas. Los heterótrofos absorben o ingieren las moléculas orgánicas elaboradas por los autótrofos, de los cuales dependen.

El hecho de mantenerlos agrupados bajo la denominación de “microorganismos” tal vez obedezca más a razones prácticas que a cuestiones de semejanza entre ellos, ya que en estos grupos se pueden aplicar los mismos métodos básicos de estudio (aislamiento, cultivo *in vitro*, identificación) con pequeñas variaciones.

Las eubacterias

Las bacterias son organismos unicelulares procariontes recubiertos por una pared celular que los protege. Además del ADN cromosómico pueden tener moléculas circulares extras de ADN, denominadas plásmidos.

TABLA 1. Los microorganismos en el marco de una clasificación biológica actual

Dominio	Bacteria	Archaea	Eukarya			
Reino	Eubacteria	Archaeobacteria	Protista	Fungi	Plantae	Animalia
Tipo de célula	Procariota	Procariota	Eucariota	Eucariota	Eucariota	Eucariota
Estructura celular	Pared celular con peptidoglicano	Pared celular sin peptidoglicano	Pared celular de celulosa, en algunos. Presencia de cloroplastos, en algunos	Pared celular de quitina. Ausencia de cloroplastos	Pared celular de celulosa. Presencia de cloroplastos	Sin pared celular. Ausencia de cloroplastos
Organización	Unicelular	Unicelular	Uni o pluricelular	Uni o pluricelular	Pluricelular	Pluricelular
Nutrición*	Autotrófica o heterotrófica	Autotrófica o heterotrófica	Autotrófica o heterotrófica	Heterotrófica (absorción)	Autotrófica	Heterotrófica (ingestión)
Ejemplos	Eubacterias	Arqueas	Protozoarios y algas	Levaduras, mohos y setas	Bríofitas (musgos), pteridófitas (helechos), gimnospermas y angiospermas	Invertebrados y cordados

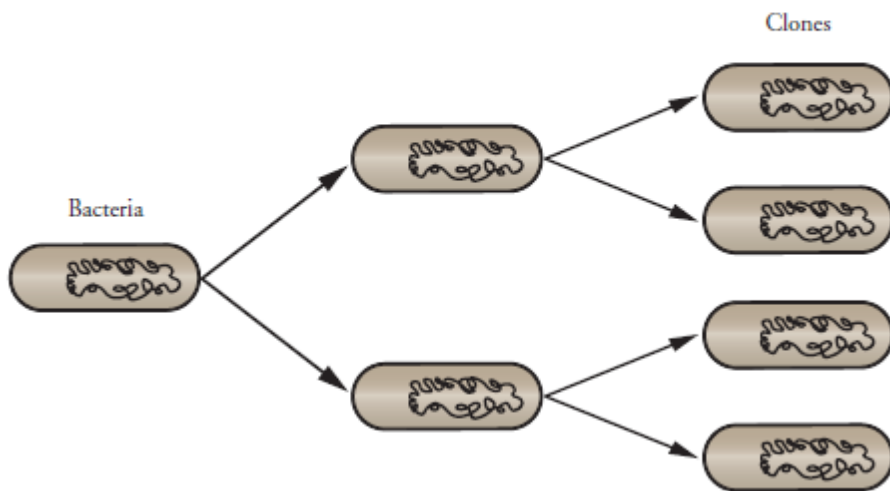
* Nutrición: autotrófica o heterotrófica.

Nutrición autotrófica: cuando un organismo produce su propio alimento a partir de sustancias inorgánicas y de una fuente de energía. Los seres autotróficos pueden realizar fotosíntesis (para la cual la fuente de energía es la luz solar) o quimiosíntesis (para la cual la fuente de energía es una reacción química exotérmica).

Nutrición heterotrófica: cuando un organismo se alimenta de moléculas orgánicas elaboradas por otros seres vivos por absorción (captación de nutrientes disueltos en el agua), o ingestión (entrada de partículas de alimentos no disueltas en agua).

FIGURA 1. Bacterias y clones

Por división binaria de una bacteria se genera un clon de bacterias iguales



condiciones favorables de humedad, acidez y temperatura, las bacterias se multiplican rápidamente por fisión celular (o binaria) produciendo millones de células en pocas horas (Figura 1). En una de sus acepciones, la palabra “clon” se aplica a las células que derivan de una única célula. Sin embargo, algunas especies bacterianas también pueden reproducirse en forma sexuada, posibilitando la recombinación del material genético.

Las eubacterias forman un grupo con más de 5.000 especies conocidas. Pequeñas (0,0005-0,005 mm) y de formas diversas (esféricas, en bastones, helicoidales), se las puede encontrar solitarias, de a pares,

en cadenas o formando agregados. Algunas se mueven libremente mediante uno o más flagelos distribuidos en la superficie celular, otras se adhieren mediante pili (pelos) o fimbrias a un organismo hospedador. El grupo incluye también a las cianobacterias, que serán comentadas más adelante junto con las algas.

En condiciones desfavorables, algunas bacterias forman esporas que sobreviven en forma latente hasta que las condiciones ambientales se vuelvan favorables y puedan germinar, retomando su actividad fisiológica. Un ejemplo interesante, en Europa del siglo XIX, es el de la existencia de ciertos “campos malditos”, donde las ovejas no debían pastar ni transitar, debido al alto riesgo de contraer carbunco o ántrax. De hecho, los bacilos presentes en los animales muertos por la enfermedad y enterrados en esos campos formaban esporas que, al ser llevadas a la superficie por las lombrices, contaminaban los pastizales.

La técnica de laboratorio conocida como coloración de Gram permite diferenciar a las bacterias por la estructura de la pared celular.

Entre las Gram positivas, cuya pared celular es más simple, encontramos géneros como *Clostridium*, *Bacillus*, *Mycobacterium* (con algunas especies que causan la tuberculosis y la lepra) y los actinomicetes, como *Streptomyces*, productora de antibióticos como la estreptomicina.

Entre las Gram negativas encontramos a los micoplasmas, *Escherichia coli* (colonizadora del tracto digestivo de muchos organismos), *Salmonella* (agente causal de muchas intoxicaciones alimentarias), las cianobacterias fotosintéticas, las espiroquetas (*Treponema pallidum* y *Borrelia burgdorferi*, que causan la sífilis y la enfermedad de Lyme, respectivamente) y las clamidias (responsables de infecciones genitales, tracomas y uretritis).

Se estima que las bacterias son responsables de aproximadamente la mitad de las enfermedades humanas. Las Gram negativas resultan más difíciles de tratar que las Gram positivas, debido a la protección dada por una capa adicional en la pared celular, que dificulta la entrada de antibióticos.

Del mismo modo que el hombre, los animales y las plantas también son afectados por patógenos bacterianos que invaden los tejidos del hospedador o liberan sustancias tóxicas (exo y endotoxinas).

Pero no todas las bacterias son patogénicas. Su participación en el reciclado de los elementos es fundamental desde el punto de vista ecológico, posibilitando el tratamiento de residuos y de aguas servidas, la eliminación de compuestos contaminantes (biorremediación) y la extracción de minerales (biolixiviación). También hay bacterias que fijan nitrógeno o producen toxinas pesticidas, contribuyendo a la mejora de las prácticas agrícolas.

Debido a sus características metabólicas, muchas eubacterias se utilizan en la producción de alimentos (lácteos, vinagre, pickles y aceitunas) y aditivos (vitaminas, aminoácidos, gomas emulsificantes y estabilizantes), en la industria química (acetona, butanol y plásticos biodegradables) y en la industria farmacéutica (vacunas, toxinas y antibióticos). También se emplean en la producción de enzimas para uso industrial y medicinal (Tabla 2).

Las arqueobacterias o arqueobacterias

Las arqueobacterias difieren de las eubacterias en la estructura de la pared celular y en algunas características metabólicas relacionadas con la síntesis de proteínas, que las aproximan a los eucariontes. Algunas viven en hábitats inhóspitos, como las solfataras de los volcanes o los géiseres en Islandia y Costa Rica, donde las temperaturas superan los 60-80 °C. Otras prosperan en lagos donde la concentración salina es altísima, como el Gran Lago Salado (Estados Unidos) o el Mar Muerto (Israel). Existen también entre las arqueobacterias algunos géneros con vías metabólicas peculiares, dependientes del azufre o productoras de metano.

Debido a estas propiedades, en los últimos años se ha acelerado la prospección de arqueobacterias con propiedades potencialmente interesantes, para ser empleadas en procesos industriales que exijan condiciones ambientales extremas. Sin embargo, estudios recientes de ecología molecular muestran que las arqueobacterias no se limitan a ambientes extremos, y que su diversidad sería mucho mayor que lo previsto.

Los protozoarios

Los protozoarios se clasifican en el reino Protista, un grupo mal definido de seres eucariontes que pueden ser unicelulares o pluricelulares, autótrofos o heterótrofos, de reproducción sexual o asexual. Los protozoarios, en particular, son unicelulares y heterótrofos, con un tamaño que varía entre 0,002 y 1 mm. Algunos viven libres en ambientes marinos, de agua dulce, o simplemente lugares muy húmedos. Otros parasitan a otras especies causándoles enfermedades, como *Giardia*, *Amoeba*, *Trichomonas*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, etc. Debido a la importancia fundamental que tienen para el ser humano desde el punto de vista médico, la caracterización molecular de estos protozoarios puede dar origen a pruebas de diagnóstico y vacunas.

Las algas

Clasificadas en el reino Protista junto con los protozoarios, las algas son organismos uni o pluricelulares, autótrofos y acuáticos. Situadas en la base de las cadenas alimenticias acuáticas, las algas cumplen un papel fundamental en la biosfera, porque son capaces de fijar dióxido de carbono y producir oxígeno. Algunas participan en la formación de suelos y en la fijación de nitrógeno. Las macroalgas marinas (algas pardas, algas rojas y parte de las algas verdes) forman filamentos y talos que pueden llegar a medir más de treinta metros, a pesar de no tener órganos diferenciados. Son utilizadas en la alimentación humana (*Porphyra* o nori; *Laminaria*, como el kombu, en Oriente y el cochayuyo en Chile) y, también, como abono. Debido a su capacidad de formar geles y emulsiones, los ficocoloides extraídos de las algas (agar, carragenina, alginato) se emplean en los laboratorios de investigación y de análisis clínicos para la preparación de medios para el cultivo de bacterias y hongos. También se los usa en varias industrias, tales como la alimentaria (helados, cremas, jaleas, etc.), la farmacéutica (laxantes, cápsulas de remedios) y la cosmética (cremas, jabones, champúes, dentífricos, etcétera).

Las microalgas representan a un grupo extremadamente diverso de unas 25.000 especies, de las cuales solo un pequeño grupo está bien estudiado. Este grupo comprende aproximadamente cincuenta especies de microorganismos fotosintéticos, tanto eucariontes (diatomeas, dinoflagelados, euglenoides y otras algas verdes) como procariontes (cianobacterias, antes llamadas algas azul-verdosas).

La proliferación de microalgas como floraciones en la naturaleza (mareas rojas) o en reservorios, generalmente debida a la eutrofización de las aguas, puede causar la muerte de otros organismos y es muy peligrosa cuando se acompaña de la liberación de toxinas. Pero no siempre es así. La incorporación de microalgas en los tanques en algunos sistemas de tratamiento de efluentes permite remover nutrientes inorgánicos y adicionar oxígeno al proceso. También se usan como indicadores de polución.

La degradación de la biomasa de algas por microorganismos anaerobios produce metano, un gas combustible. Otra alternativa energética interesante es la producción de hidrógeno por algas.

Las microalgas también se usan en la alimentación animal, como ración para la avicultura y la acuicultura. Algunas de las sustancias sintetizadas por ellas son incluidas en la alimentación humana como complementos nutricionales y sustitutos proteicos (aminoácidos, ácidos grasos y vitaminas B12 y β -caroteno). Los ácidos grasos, así como varias otras sustancias (ficocoloides,

pigmentos, glicerol, abrasivos finos, etc.) se usan en la formulación de cosméticos.

Otros compuestos biológicamente activos son de gran interés para la industria farmacéutica (Tabla 3).

Los hongos

El reino Fungi comprende más de 100.000 especies. Los hongos son organismos eucariontes, uni o pluricelulares, con una pared celular formada por quitina. Todos son heterótrofos y pueden reproducirse en forma sexual o asexual. Tienen gran importancia como agentes biológicos (Tabla 4). Las levaduras son hongos unicelulares que se desarrollan en lugares húmedos y se reproducen por brotación. A este grupo pertenece uno de los microorganismos de mayor importancia económica: *Saccharomyces cerevisiae*, la popular levadura de cerveza (o simplemente levadura) utilizada tradicionalmente en la preparación de alimentos y bebidas, así como en la producción de etanol, vitaminas y otros metabolitos. También se la emplea, modificada por ingeniería genética, para producir una vacuna contra la hepatitis B. Sin embargo, no todas las levaduras son benéficas. *Candida albicans*, por ejemplo, es un microorganismo oportunista de la flora normal humana que, en ciertas condiciones, puede proliferar de manera anormal tornándose patogénica.

En los mohos, las células forman una maraña de filamentos o hifas, denominada micelio. Los mohos crecen rápidamente por fragmentación del micelio y se diseminan mediante esporas, como *Aspergillus niger*, un productor de ácido cítrico; o como *Rhizopus*, el moho negro del pan, que se expande sobre su superficie a pesar de los conservantes que se agregan; o como *Aspergillus flavus*, un moho que crece en las semillas de leguminosas (maní, poroto, soja) produciendo una toxina poderosa, la aflatoxina, que causa graves intoxicaciones.

En este grupo también se encuentra *Penicillium*, un género que cuenta con diversas especies, una de las cuales es empleada en la industria farmacéutica para la producción de penicilina, y otras en la industria de alimentos, para la maduración de quesos como el roquefort, el gorgonzola y el camembert.

Las setas son los cuerpos reproductivos de muchos hongos. Algunos son venenosos, como los *Amanita*, y otros producen alucinógenos, como la psilocibina, usada por grupos nativos mexicanos en rituales religiosos, o la ergotamina, sintetizada químicamente en el siglo XX con el nombre de LSD (ácido lisérgico). Pero también hay setas comestibles, como los géneros *Agaricus* (champignon), *Shiitake* y *Pleurotus*, que son cultivados y comercializados por el hombre.

Los hongos destruyen en el campo un cuarto de la cosecha de frutas y verduras. Enfermedades como la roya del café, la fusariosis del trigo y el ergot del centeno afectan seriamente a la agricultura. En la Irlanda del siglo XIX, el hongo *Phytophthora infestans* atacó a los cultivos de papa, destruyendo una fuente básica de alimentación. La enfermedad causó un millón de muertes y la emigración forzada de buena parte de la población.

Los líquenes resultan de la simbiosis entre un hongo y un alga. Algunos son comestibles y se cree que el líquen *Lecanora esculenta* era el maná mencionado en la Biblia. El grupo no ha sido muy explotado económicamente, a pesar de habersele encontrado aplicaciones como colorante (tintura de tornasol, un indicador de pH), tintura para telas y como fijador en la industria de perfumes. También son indicadores de polución (monitoreo biológico).

Por su parte las micorrizas –otra asociación, esta vez entre un hongo filamentoso y las raíces de las plantas vasculares– ocupan un lugar destacado en la agricultura en suelos tropicales al facilitar la solubilización de los fosfatos.

Los virus

Los virus son partículas inertes sin ninguna actividad metabólica, en el límite entre lo “vivo” y lo “no vivo”. Los menores miden 20 nanómetros (1 nm = 10⁻⁴ mm). Pueden atravesar filtros

extremadamente finos y cristalizar. Su estructura es muy simple: un ácido nucleico (ADN o ARN, como cadena simple o doble) dentro de una cubierta proteica o cápside (Figura 2). Muchos poseen enzimas que serán liberadas dentro de la célula hospedadora.

Como parásitos obligados de bacterias, plantas o animales, al infectar una célula viva pasan a usarla para su propia reproducción. Algunos se integran al genoma de la célula infectada (bacteriófagos, retrovirus), y son utilizados actualmente como vectores para introducir genes en una célula hospedadora (Figura 3).

Entre los virus que causan enfermedades humanas encontramos el poliovirus, el VIH, el coronavirus responsable del SAR (síndrome agudo respiratorio), etc. Algunos infectan a las células animales normales y las transforman en células cancerosas.

Los virus que infectan insectos pueden emplearse en el control de plagas. El Baculovirus, por ejemplo, evita la aplicación de 1,2 millones de litros de insecticidas por año en los campos de soja brasileños atacados por la oruga de las leguminosas.

2. LAS TÉCNICAS DE LABORATORIO

Hay diversos tipos de técnicas que facilitan el trabajo de laboratorio. La identificación de un microorganismo requiere la observación microscópica y la utilización de algunos métodos específicos de coloración, complementados eventualmente por pruebas bioquímicas, genéticas e inmunológicas. Para encontrar y mantener una cepa bacteriana en el laboratorio se usan técnicas que, con algunas variaciones, pueden ser aplicadas a hongos y algas.

El cultivo de un microorganismo exige, además del diseño de un medio nutritivo que satisfaga sus necesidades metabólicas, un cuidado especial con las condiciones de temperatura e iluminación en las que será incubado. Los medios nutritivos se emplean líquidos o solidificados con agar, una sustancia que les confiere una consistencia gelatinosa. Los recipientes más comunes son tubos de ensayo y placas de vidrio o plástico circulares con tapa (Placas de Petri); y para inocular los medios se utilizan ansas de platino y pipetas de diferentes tipos.

La mayor dificultad es conseguir la multiplicación del microorganismo deseado y al mismo tiempo evitar las contaminaciones, es decir la proliferación de otros microorganismos. Para eso, se trabaja en condiciones asépticas, que demandan la esterilización previa del material de vidrio, de los medios de cultivo y de los instrumentos (ansas, pipetas) que serán utilizados. Los equipamientos diseñados para trabajar bajo un flujo de aire esterilizado son una gran ayuda para el profesional, porque permiten evitar la contaminación con los microorganismos del ambiente, durante la transferencia del material biológico. Finalmente, al descartar el material utilizado es indispensable proceder de modo tal que no se liberen microorganismos perjudiciales al medioambiente.

Los microorganismos se aíslan a partir de muestras de suelo, agua, aire y fluidos corporales. Las cepas obtenidas se conservan como cultivos puros.

Para obtener microorganismos con características diferentes se inducen mutaciones y se seleccionan las cepas mutantes. Si bien cada laboratorio suele mantener los *stocks* microbianos necesarios para su trabajo, estos también pueden ser solicitados a centros especializados (colecciones de cultivos).

El número de microorganismos presentes en una muestra es estimado por diversos métodos entre los cuales se incluyen el conteo (microscópico, electrónico o en placa) y medidas de la turbidez del medio, de la masa seca, del contenido de nitrógeno o de la actividad metabólica.

En general, como las técnicas clásicas son trabajosas y se demora mucho tiempo hasta llegar a un diagnóstico clínico, están siendo reemplazadas por técnicas más rápidas que identifican a los microorganismos por algunas secuencias características del ADN.

También dependemos de la genómica para ampliar nuestro conocimiento de las comunidades microbianas del ambiente, porque el número de especies que conseguimos cultivar en el laboratorio no representa más del 1 al 5% de la totalidad existente. Aunque la microbiología es una disciplina que data del siglo XIX, nuestra ignorancia sobre el mundo microbiano todavía es enorme.

3. BIOSEGURIDAD Y BIOPROTECCIÓN

Los microorganismos se clasifican según el riesgo de causar daños a la comunidad y a los profesionales que trabajan con ellos. Los criterios fundamentales son la patogenicidad para el hombre, la virulencia, el modo de transmisión, la endemidad y la existencia o no de medidas preventivas y un tratamiento terapéutico eficaz. En función de esas características, se definen cuatro grupos de riesgo.

Grupo 1. Bajo riesgo individual y colectivo. Microorganismos que nunca fueron descritos como agentes causales de enfermedades para el hombre y que no constituyen ningún riesgo para el medioambiente. Ejemplos: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (algunas cepas).

Grupo 2. Riesgo individual moderado, riesgo colectivo limitado. Microorganismos que pueden causar enfermedades en el hombre, con poca probabilidad de alto riesgo para los profesionales del laboratorio. Ejemplos:

Salmonella, *Toxoplasma*, *Schistosoma mansoni*, virus del sarampión, virus de la hepatitis B.

Grupo 3. Riesgo individual elevado, riesgo colectivo bajo. Microorganismos que pueden causar enfermedades graves a los profesionales del laboratorio.

Ejemplos: *Mycobacterium tuberculosis* y VIH.

comunidad. Microorganismos que causan enfermedades graves para el hombre.

Ejemplos: virus Ébola, virus Marburg.

A cada uno de los grupos anteriores le corresponden normas estrictas de bioseguridad, que abarcan desde la arquitectura del laboratorio y las características de los equipamientos, hasta las precauciones que deben tomar los profesionales y la forma en que se descartan los desechos (Figura 4).

Los microorganismos genéticamente modificados se clasifican en función del grupo de riesgo al que pertenecen las cepas donantes y receptoras. Según la Organización Mundial de la Salud, el término bioseguridad abarca los principios, técnicas y prácticas necesarias para evitar la exposición accidental a patógenos y toxinas, o su liberación accidental. El concepto más reciente de bioprotección (o biocustodia) se refiere a las medidas de protección de la institución y del personal, destinadas a evitar el riesgo de pérdida, robo, uso incorrecto, desvíos o liberación intencional de patógenos y toxinas (bioterrorismo).

4. MICROORGANISMOS COMO AGENTES BIOLÓGICOS

La importancia biotecnológica de algunos microorganismos se describe en la Tabla 5.

TABLA 5. Agentes microbianos de importancia biotecnológica

<i>Arquibacterias</i>	<i>Utilización</i>
<i>Thermus aquaticus</i>	Aislada de un charco del Parque Nacional de Yellowstone (Estados Unidos), esta bacteria produce una enzima que copia el ADN a temperatura alta. Esta enzima permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN en un proceso automatizado que revolucionó a la biotecnología, llamado PCR (<i>polymerase chain reaction</i> o reacción en cadena de la polimerasa).
<i>Bacterias metanogénicas</i>	Viven en lugares donde no hay oxígeno, sea en el tubo digestivo de algunos animales (ganado, termitas) o en los pantanos. Estas bacterias transforman el acetato, resultante de la degradación de la celulosa por otras bacterias, en metano, un gas combustible.

<i>Eubacterias</i>	<i>Utilización</i>
<i>Bacterias lácticas</i>	Los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Streptococcus</i> son responsables de varios procesos, tales como la elaboración de quesos y yogures, el añejamiento de los vinos, la conservación de los alimentos (sauerkraut o repollo fermentado, silaje para el ganado), la producción de ácido láctico, aditivo utilizado en la industria alimentaria como acidulante y estabilizante.
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Este microorganismo prolifera en el suelo y en la superficie de las plantas, sintetizando una toxina fatal para las larvas de ciertos insectos. La toxina es producida comercialmente desde hace más de 40 años; representa el 90% de las ventas de insecticidas biológicos y ha reducido la necesidad de aplicación de pesticidas químicos en el campo. En los últimos años se ha introducido el gen de la toxina en plantas como el algodón y el maíz para que sinteticen directamente el insecticida.
<i>Streptomyces</i>	Bacterias del suelo que producen sustancias antibióticas (estreptomomicina, tetraciclina, eritromicina), antifúngicas (nistatina), herbicidas, antitumorales y supresoras del rechazo de trasplantes. Tienen el olor característico de la tierra removida.
<i>Pseudomonas</i>	Se usan varias cepas en la eliminación de contaminantes. Algunas degradan moléculas de hidrocarburos, como los presentes en los derrames accidentales de petróleo; otras pueden remover el mercurio del agua.

<i>Eubacterias</i>	<i>Utilización</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Agente patogénico para las plantas dicotiledóneas en las que desarrollan tumores o agallas. Con la eliminación de un gen pierde la capacidad de provocar tumores conservando la capacidad infecciosa. Es utilizada en la ingeniería genética de plantas.
<i>Bacterias butíricas</i>	En la industria textil, <i>Clostridium butiricum</i> libera las fibras vegetales durante la maceración del cáñamo y del lino. <i>Clostridium acetobutyricum</i> se usa en la producción industrial de acetona y butanol. <i>Clostridium botulinum</i> produce una toxina poderosísima; se calcula que un gramo de esta bastaría para matar a un millón de personas. La ingestión de conservas contaminadas y mal esterilizadas suele tener un desenlace fatal. Por su acción inhibitoria de la contracción muscular, la toxina botulínica es usada en concentraciones muy pequeñas para reducir arrugas y marcas de expresión durante un cierto tiempo (efecto cosmético).
<i>Escherichia coli</i>	<p>Descubierta en 1855, esta bacteria Gram-negativa vive en el tracto digestivo del hombre y de otros animales. Tiene forma de bastón (0,002 mm de largo, 0,0008 mm de diámetro), 1 a 4 moléculas de ADN y 15.000 a 30.000 ribosomas. Tiene flagelos y "pelos" que le permiten moverse rápidamente. Algunas cepas son patógenas, pudiendo contaminar los alimentos (carne, leche, vegetales) que deben cocinarse adecuadamente. Los requerimientos nutricionales básicos son simples: agua, sales minerales, una fuente de nitrógeno y una fuente de energía. En condiciones adecuadas se divide cada 20-40 minutos, y también puede reproducirse de manera sexual (conjugación).</p> <p>Debido a la facilidad con que se la puede cultivar en el laboratorio, <i>Escherichia coli</i> se ha transformado en una herramienta indispensable para estudios bioquímicos y genéticos, incluyendo la ingeniería genética. Su genoma comprende 4,6 millones de pares de bases que codifican unas 4.000 proteínas diferentes.</p> <p>La introducción de transgenes en <i>Escherichia coli</i> K12, una cepa inofensiva de laboratorio, posibilitó los primeros procesos de producción de insulina, de interferón y de hormona de crecimiento. Sin embargo, por tratarse de una célula procarionte no siempre es la mejor opción como "fábrica" para la síntesis de productos de origen animal o vegetal, de a poco ha sido sustituida por células eucariontes, como las levaduras.</p>

<i>Algas</i>	<i>Utilización</i>
<i>Spirulina</i>	Su alto tenor proteico, correspondiente al 60% del peso seco, le confiere un elevado valor nutritivo (las proteínas representan solo el 2% del peso seco de la papa y el 6-10% del trigo, aproximadamente). Cuando llegaron los españoles, los aztecas ya preparaban unas galletas (tecuilat) con la <i>Spirulina</i> colectada en el lago Texcoco. En África, en el lago Chad, aún hoy se la colecta y consume como alimento. <i>Spirulina</i> y <i>Chlorella</i> se venden en tabletas como complemento dietario.
<i>Dunaliella</i>	Vive en medios de alta salinidad, evitando la deshidratación mediante la acumulación de glicerol. Puede crecer en el Mar Muerto. También se la cultiva en tanques o lagunas cercanas al Mar Rojo, para la extracción del glicerol y de β -caroteno, otro producto metabólico.

<i>Hongos</i>	<i>Utilización</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Conocida como la levadura de cerveza o "levadura", se utiliza en la preparación de alimentos (pan, bizcochos, fermento de panadería) y de bebidas (cerveza, vino y destilados), así como en la producción de otras sustancias de importancia industrial (etanol, vitaminas y otros metabolitos). La levadura crece fácilmente en el laboratorio. También puede ser manipulada genéticamente. En los fermentadores o biorreactores industriales, donde se multiplica rápidamente a partir de materias primas de bajo costo, permanece activa durante períodos largos, y al concluir el proceso, puede ser separada por filtración o centrifugación. Con 12.000.000 de pares de bases y 6.000 genes en 16 cromosomas, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> fue, en 1997, el primer organismo eucariote en tener su genoma secuenciado.
<i>Aspergillus</i>	Algunas especies alcanzan gran importancia industrial, como <i>A. niger</i> , que se utiliza para la producción de ácido cítrico o de enzimas (en cepas modificadas genéticamente).
<i>Penicillium</i>	Algunas especies se utilizan en la industria farmacéutica (penicilina) o alimentaria (quesos "azules" como el roquefort y gorgonzola o el queso camembert).

SELECCION, MANTENIMIENTO Y MEJORAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE INTERES INDUSTRIAL

Selección

Debido a que el éxito o fracaso de un proceso fermentativo comienza con el microorganismo utilizado, en la elección del mismo se deberían tener en cuenta ciertos criterios generales que se indican a continuación:

1. La cepa a utilizar debe ser genéticamente estable.

- 2 Su velocidad de crecimiento debería ser alta.
3. La cepa debe estar libre de contaminantes, incluidos fagos.
4. Sus requerimientos nutricionales deberían ser satisfechos a partir de medios de cultivo de costo reducido.
5. Debe ser de fácil conservación por largos períodos de tiempo, sin pérdida de sus características particulares.
6. Debería llevar a cabo el proceso fermentativo completo en un tiempo corto.
7. Si el objetivo del proceso es un producto, éste debería ser de alto rendimiento y de fácil extracción del medio de cultivo.

Los microorganismos que se utilizan en un proceso, pueden ser obtenidos por aislamiento a partir de fuentes naturales o de una colección de cultivos. A nivel industrial, en general, cada firma posee su propia colección de organismos, muchos de los cuales han sido mejorados a través de técnicas clásicas de mutación o de ingeniería genética. Sin embargo, estas cepas sólo son empleadas por la industria que las posee, debido al gran valor comercial de las mismas. En algunos casos se dispone de organismos modificados genéticamente para llevar a cabo reacciones específicas de biosíntesis, degradación o biocatálisis, los cuales están protegidos por patentes. Esto significa que un gran porcentaje de organismos aislados o modificados no son disponibles para uso general en laboratorios. Existen en el mundo un gran número de colecciones depositarias de cultivos. Entre la diversidad de colecciones se destacan: "American Type Culture Collection", USA, la cual mantiene bacterias, levaduras, algas, actinomycetes, mohos, protozoos, virus y líneas celulares; "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes" del Institut Pasteur, Francia; "Northern Regional Research Laboratory" (NRRL), de Peoria, USA, y "National Collection of Type Cultures", Londres, Inglaterra.

Si el organismo a utilizar es aislado de fuentes naturales como agua, suelo, plantas y desechos, la elección del material de partida puede hacerse teniendo en cuenta que el organismo exprese en ese ambiente las propiedades que son de interés. Por ejemplo, en suelos tratados con pesticidas se podrían encontrar organismos adaptados a la degradación de estos productos químicos; o en larvas de insectos muertos agentes causales de la muerte.

Elegida la fuente de aislamiento, las posibilidades de éxito dependen de la técnica elegida para el mismo; en este caso las alternativas son: a) aislamiento directo, o b) enriquecimiento del cultivo con o sin pretratamiento de la muestra.

Una vez efectuado el muestreo y selección (screening) para el aislamiento de una cepa de interés, la misma deberá ser caracterizada. En este procedimiento se debe tener en cuenta que la composición química del material a partir del cual se va a realizar el aislamiento comienza a variar a partir del momento en que es tomada la muestra, por lo tanto ésta se debe procesar rápidamente, tratando de evitar alteraciones que afecten a la población de interés.

- a) *Aislamiento directo*: en este caso es deseable que el medio que se utiliza para el aislamiento permita la máxima expresión del material genético del organismo. Si se busca por ejemplo un organismo con acción antimicrobiana, se puede crecer al potencial productor, en una caja de petri en presencia del o los organismos contra los cuales se requiere la acción antimicrobiana, observándose la producción del inhibidor por las zonas de inhibición de crecimiento. Para la detección de productores de factores de crecimiento tales como aminoácidos y nucleótidos se utiliza la estimulación del desarrollo de bacterias auxótrofas por un lisado del organismo. Esto se puede llevar a cabo en medios sólidos. En este caso se debe tener una "réplica" de la caja a ensayar. Una vez obtenido el crecimiento en la primera caja, se replica a una segunda, antes de "matar" las colonias con luz. U.V., por ejemplo. Esta caja es luego cargada con agar

conteniendo una suspensión del organismo auxótrofo al producto buscado. Después de un período de incubación se observa crecimiento en forma de halo alrededor de las colonias productoras, lo que permite el aislamiento de este organismo de la placa réplica.

- b) *Enriquecimiento del cultivo*: esta técnica consiste en incrementar en una población mixta el número de organismos de interés en relación al resto. De esta forma se busca favorecer el crecimiento de un tipo dado de microorganismos frente a condiciones de cultivo adecuadas al mismo, o de condiciones inapropiadas para el desarrollo de los otros. Esto se logra mediante el empleo de sustratos específicos o ciertos inhibidores. Para mantener la fuerza selectiva del medio, el cual se modifica por el crecimiento del organismo buscado, se realizan subcultivos periódicos en medio fresco. Esto lleva a que el organismo de interés sea el dominante de la población, lo cual facilita su posterior aislamiento en medio sólido. Se debe considerar en este caso el efecto del medio sobre la velocidad específica de crecimiento (μ).

La selección de un organismo por este procedimiento depende de su valor de μ comparado con los de los otros organismos. Evidentemente el dominante de la población será el que posea el mayor valor de μ para las condiciones de cultivo empleadas. Sin embargo no necesariamente será más útil un organismo de μ más alto; puede ser deseable uno con mayor afinidad por el sustrato. El problema de selección puede ser superado empleando el sistema de cultivo continuo, donde la fuerza de selección se mantiene a un nivel constante y el organismo dominante será seleccionado por su afinidad por el sustrato, más que por su μ máxima.

Mantenimiento o conservación de los cultivos

Los objetivos de la conservación de los cultivos se podrían resumir en los siguientes aspectos: a) preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas; b) preservar los niveles de su productividad inicial; c) lograr que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad. Esto último puede ser un factor esencial en la selección de un método de preservación.

En todo trabajo de Microbiología se deben conocer las características de la población con la cual se va a trabajar (propiedades morfológicas y bioquímicas).

En este sentido, tanto en la conservación como en el desarrollo del cultivo, ya sea el que suministra o el que recibe la cepa, deberían usar las mismas técnicas metodológicas.

Tanto para el mantenimiento, preparación y propagación de inóculos se deben usar métodos reproducibles que no produzcan variaciones o pérdidas de las características de la cepa empleada.

No hay métodos de mantenimiento en procesos industriales que sean comunes a todas las industrias, empleándose en algunos casos métodos específicos secretos.

El conocimiento de las características del cultivo es esencial en la elección de un método de preservación. La identidad del cultivo puede conocerse en base a sus características de crecimiento en uno o más medios específicos, tomando en consideración propiedades macro y microscópicas exhibidas, o en base a una evaluación más exhaustiva empleando muchos ensayos bioquímicos, biológicos, inmunológicos y genéticos.

En general los cultivos no son estudiados en detalle debido a la casi imposibilidad de determinar en cada etapa si ha habido o no alteración genética. En la mayoría de las situaciones solamente se pueden notar cambios mensurables u observables tales como pigmentación, morfología, reacciones fermentativas, propiedades microscópicas, etc. El análisis de estos parámetros junto con la determinación cuantitativa del recuento de colonias antes y después del proceso de mantenimiento brindan la información necesaria para la correcta evaluación de la técnica de conservación a elegir.

Los métodos de preservación o mantenimiento más importantes son los siguientes:

Subcultivos

Es un método común de conservación, que consiste en el repique periódico del cultivo en un medio nutritivo fresco. El intervalo de transferencia varía con el microorganismo, debiendo considerarse el medio adecuado para cada especie.

Una vez desarrollados los cultivos se mantienen a 4 °C durante lapsos que oscilan entre 15 días y 2 meses. Los inconvenientes que presenta son varios: a) incremento de la posibilidad de mutación con cada transferencia, con pérdida de las características del organismo; b) riesgo de contaminación; c) alteraciones en el medio de cultivo, durante la estadía en frío, en la cual se produce una desecación gradual del mismo.

Mantenimiento bajo capa de aceite

Es una técnica simple y efectiva para prolongar la conservación de muchos organismos y consiste en cubrir completamente el cultivo después de su desarrollo en medio sólido, con una capa de aceite mineral o vaselina estéril. Los cultivos en esta forma se pueden conservar a temperatura ambiente o aún mejor en heladera por períodos de varios años. Algunos autores sostienen que en estas condiciones los microorganismos pueden continuar reproduciéndose, con posibilidades de aparición de mutantes; sin embargo se acepta que estas alteraciones no se observan hasta los tres años de mantenimiento.

Congelación

Debido a que la actividad metabólica de una célula se reduce considerablemente por mantenimiento a muy baja temperatura, la congelación es una técnica de elección, ya sea para cortos o largos períodos de tiempo. A esto ha contribuido también la mayor disponibilidad de nitrógeno líquido (-196 °C) y el mejoramiento de los equipos de refrigeración. La técnica involucra el crecimiento del cultivo hasta la fase estacionaria, ya que en general en esta etapa las células son más resistentes a los daños por congelación y descongelación, que las de fase exponencial.

También es aconsejable utilizar una densidad celular elevada en la congelación, debido a que, cuando parte de las células se lisan se liberarían sustancias crioprotectoras que aumentarían el porcentaje de células sobrevivientes. Las células a congelar pueden ser resuspendidas directamente en un agente crioprotector o se puede agregar el mismo como aditivo al medio de cultivo. El más empleado es glicerol al 10%, aunque otros agentes como dimetilsulfóxido, glucosa, dextranos, sacarosa, suero de conejo, lactosa y extrato de malta, han sido también empleados.

La suspensión celular es colocada en ampollas (vidrio o plástico) y sellada antes de colocarla bajo nitrógeno líquido. Uno de los problemas de esta técnica se refiere a la velocidad de congelación.

Muchos estudios son coincidentes en señalar que una velocidad de congelación lenta y una rápida descongelación rinden los mayores números de células viables. Se encontró que dependiendo de la naturaleza de las células, existe una velocidad de congelación óptima en cada caso para obtener una máxima sobrevivencia. Como criterio general se puede decir que, lo más ampliamente usado es el enfriamiento a 1 °C min⁻¹ (ya que una rápida congelación causa ruptura de membranas) hasta -20 °C y luego un rápido descenso.

En cuanto a la temperatura de conservación, la más baja recomendada es -70 °C, ya que a temperaturas más altas ocurren algunas recrystalizaciones, las cuales si son intracelulares son letales para las células.

En caso de nitrógeno líquido, la conservación podría prolongarse por años, asegurando una buena provisión del mismo y disponiendo de equipos con sistemas de alarma en caso de fluctuaciones de temperatura.

Cultivos en tierra

La tierra estéril puede ser inoculada con un cultivo e incubada varios días para inducir esporulación de bacilos aerobios y anaerobios. Una vez que la misma se manifiesta, la tierra es secada (desecador) y el cultivo mantenido de esta forma en una atmósfera seca o en refrigerador. El método ha sido utilizado ampliamente con hongos y actinomicetes, los cuales han sido mantenidos en estas condiciones varios años. También se puede utilizar tierra para la conservación directa de suspensiones de esporos.

Preservación en celulosa

El empleo de un soporte de papel para el mantenimiento de células en condiciones de ausencia de agua es un procedimiento adecuado y sencillo, para conservar cepas. La técnica consiste en embeber tiras de papel de filtro con una suspensión densa de organismos en suero, glutamato de sodio u otro agente, las mismas son posteriormente colocadas en tubos para su posterior secado bajo vacío. De esta forma se han logrado conservar cepas de *Streptomyces* y *Salmonella* por períodos de hasta 2 años a temperatura ambiente.

Liofilización

La liofilización está considerada como el método más adecuado para la preservación de microorganismos. La técnica involucra el congelamiento de un cultivo seguido por un secado bajo vacío, lo cual resulta en la sublimación de agua de la suspensión celular. La ventaja es que la mayoría de los organismos sobreviven al secado y el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.

La liofilización es apropiada para la conservación de la mayoría de las bacterias, encontrándose que las Gram-positivas sobreviven mejor que las Gram-negativas cuando se las liofiliza y mantiene en condiciones similares. También se emplea en la conservación de esporos, actinomicetes y muchos hongos incluidas levaduras. Sin embargo, no es adecuada para células animales, algas y hongos en fase de micelio.

La técnica consiste en partir de un cultivo de fase estacionaria (donde las células son usualmente más resistentes) resuspendiendo las células con un medio crioprotector, en el cual se obtenga una alta densidad celular. Unas pocas gotas de suspensión celular son transferidas a una ampolla, la cual es congelada a aproximadamente $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y deshidratada mediante una sublimación en vacío. Este debe ser mantenido en 5-10 um mediante una bomba. El secado continúa hasta llegar a valores de humedad del orden del 1%; luego, la ampolla es sellada bajo vacío. Se debe evitar la formación de radicales libres que se producen por exposición de las células al oxígeno, ya que están asociados con pérdida de viabilidad; de allí la importancia de mantener el vacío. El medio empleado en la liofilización es un factor importante en el proceso. Entre los agentes recomendados están la leche descremada en concentraciones del 10 al 20%; suero equino, mezclas de suero, glucosa y extrato de levadura; suero fetal bovino, etc. En algunos casos el efecto protector de la leche descremada es mejorado por el agregado de solutos tales como ácido ascórbico o tiourea. La sacarosa se ha empleado para reemplazar la leche descremada, y para mejorar su performance se le adiciona glutamato de sodio y bacto casitone u otro componente nitrogenado.

Normalmente la liofilización produce daños en las células, siendo los mismos en algunos casos reversibles, por lo cual éstas necesitan un tiempo de recuperación que es variable en función del tipo de daño producido. En la reconstitución de un tubo liofilizado se logra incrementar la sobrevivencia de los microorganismos si en lugar de agua destilada se agrega caldo nutritivo o el mismo medio que se usó para el crecimiento inicial de las células; de esta forma al mantenerse elevada la presión osmótica durante la rehidratación se logra que la misma proceda en forma lenta.

Se encuentra con frecuencia que el crecimiento después de la rehidratación tiene una fase de retardo extendida. Se puede reducir esta fase si se emplea para el crecimiento un medio de igual composición que el que da óptimo desarrollo pero disminuyendo su concentración original entre un 25 y un 50%.

En general no es posible determinar para cada grupo de organismos el método de conservación ideal, por lo que se trata de emplear el más adecuado. De todos, la liofilización es el más utilizado, aunque algunos organismos muestran altas tasas de mortandad. En este caso la alternativa es la congelación, a pesar de que las cepas mantenidas de esta forma son difíciles de transportar.