

CAPÍTULO 3

FISIOLOGÍA BACTERIANA

María Antonieta Cruz y Germán Hermosilla D.

La Fisiología microbiana comprende el estudio de las funciones realizadas por los microorganismos. La función fundamental de todo ser vivo es el crecimiento, esto es aumentar en forma ordenada el número y la masa de todos sus componentes celulares, tales como pared celular, membrana citoplasmática, ácidos nucleicos (ADN y ARN), flagelos, fimbrias, entre otros. Estas estructuras celulares están compuestas fundamentalmente de macromoléculas: proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos.

Las bacterias son muy eficientes fisiológicamente, sintetizan en forma muy rápida todos sus componentes celulares, siendo la mayoría autosuficientes a pesar de su simpleza estructural. Para que esto ocurra, en la bacteria se desencadenan una serie de procesos químicos que en su conjunto constituyen el metabolismo bacteriano.

En el metabolismo bacteriano, los procesos químicos por los cuales la bacteria construye componentes celulares, a partir de compuestos simples externos (nutrientes), se denomina anabolismo. En cambio, aquellas reacciones destinadas a obtener energía a partir de compuestos químicos corresponden al catabolismo.

Desde su hábitat o entorno la bacteria incorpora las sustancias necesarias para vivir, proceso llamado nutrición. Una vez incorporados estos nutrientes, a través del metabolismo bacteriano, la célula será capaz de reproducirse y transmitir su material genético a la prole.

NUTRICIÓN

Desde la época de Pasteur, se han usado como medios de cultivo, extractos de tejidos animales o vegetales, recibiendo el nombre de caldos. Sólo con los estudios de Müller se empezó a conocer en forma fraccionada los elementos que son necesarios para que una bacteria se desarrolle.

Las bacterias que evolutivamente se adaptaron a vivir libremente en la tierra y el agua, tienen requerimientos más simples que aquellas que viven en la superficie de tejidos animales, las que requieren compuestos nutritivos más complejos, como aminoácidos, vitaminas y bases nitrogenadas. En estas bacterias, la carencia de una vía metabólica determina requerimientos más complejos que las bacterias de vida libre, las cuales poseen vías metabólicas mucho más complejas.

Es difícil determinar cuáles son los mínimos nutrientes necesarios para que la bacteria sobreviva y se multiplique, sin embargo, considerando los componentes celulares, se afirma que las bacterias necesitan fundamentalmente:

Agua: Más del 80% de la composición celular bacteriana es agua. Es el solvente universal, cumple una función tampón y actúa como coenzima de enzimas hidrolasas.

Fuente de Carbono: Todos los compuestos orgánicos poseen carbono. Las fuentes más simples de carbono son el CO_2 y el CH_4 . Fuentes más complejas son aminoácidos, hidratos de carbono y lípidos.

De acuerdo a la fuente de carbono utilizada, las bacterias pueden ser clasificadas como autótrofas y heterótrofas. Es importante señalar que no existe un límite preciso de separación entre ambos grupos. Bacterias autótrofas son aquellas bacterias que utilizan como fuente de carbono sustancias simples, como CO_2 y CH_4 . En cambio, las bacterias heterótrofas requieren macromoléculas orgánicas como fuente de carbono, tales como los hidratos de carbono. La mayoría de las bacterias patógenas para el hombre son heterótrofas.

Nitrógeno (N_2): El nitrógeno, es otro elemento fundamental, ya que es el componente principal de proteínas y ácidos nucleicos, constituyendo el 10% del peso seco de una bacteria. El N_2 en el interior de la célula se encuentra como grupo amino (R-NH_2), sin embargo, las bacterias lo pueden adquirir en forma de NO_3 , NO_2 , N_2 , NH_4 , RNH_2 . Las bacterias cumplen un rol fundamental en el ciclo geoquímico del N_2 , porque la urea, que es el principal producto de excreción del metabolismo de las proteínas en los mamíferos, es inestable y se descompone rápidamente a amoníaco (NH_3), compuesto volátil que se perdería si no existieran las bacterias nitrificantes del suelo, las que por oxidación lo llevan a NO_3 no volátil. Este NO_3 puede ser captado por las plantas y transformado a compuestos orgánicos. También existen las bacterias denitrificantes que reducen el NH_3 a N_2 , en regiones anaeróbicas del suelo, liberándolo a la biosfera.

Azufre (S): Este elemento es utilizado por la bacteria para sintetizar aminoácidos azufrados, tales como cisteína y metionina. También, forma parte de vitaminas, como biotina y tiamina. La mayoría de las bacterias son capaces de obtener S a partir de SO_4 y lo reducen a H_2S , el que generalmente es transportado por una molécula de O acetil serina.

Dadores de H_2 y receptores de H_2 : Las bacterias patógenas para la especie humana, realizan su metabolismo en base a reacciones químicas, obteniendo energía fundamentalmente por óxido-reducción. De tal manera que necesitan sustratos oxidables y aceptores finales de electrones. Ej.: glucosa, como dador de electrones y O_2 , como receptor de éstos.

Iones inorgánicos (P, K, Mg): El fósforo es esencial en estructuras como ácidos nucleicos, ATP, fosfolípidos de membrana y algunas coenzimas, como NAD y FAD. El P puede ser captado como fosfato o P libre (Pi).

Elementos traza u oligoelementos: Son aquellos elementos que las bacterias requieren en cantidades muy pequeñas, como Fe, Cu, Mo, Zn. Generalmente, basta con la cantidad que contiene el H₂O u otros elementos del medio. Respecto al Fe, se ha determinado que existen en las bacterias moléculas transportadoras de Fe denominadas sideróforos, que compiten con la lactoferrina y transferrina del hospedero. Por ejemplo, *E. coli* tiene un operón que codifica para el sideróforo entero-quelina y para una proteína de membrana que actúa como un receptor que capta las deficiencias de Fe del ambiente.

Factores de crecimiento: Se definen como aquellas sustancias que son indispensables para la vida de la bacteria, pero que ella es incapaz de sintetizar Ej.: vitaminas, bases nitrogenadas, aminoácidos y colesterol. Estos compuestos hay que aportarlos al medio, puesto que su carencia no es compatible con la vida bacteriana.

Como ya se mencionó, la nutrición tiene por objeto el aporte de sustancias necesarias para el proceso de síntesis de componentes celulares o biosíntesis. Este proceso requiere energía, la cual puede ser obtenida por las bacterias desde dos fuentes: luz y compuestos químicos. Dependiendo de cual es la fuente de energía, las bacterias pueden ser clasificadas como organismos fosfosintéticos o quimiosintéticos, respectivamente. En ambos grupos, la energía se conserva en forma de ATP.

Las bacterias de importancia médica son quimiosintéticas, debido a que deben vivir en la obscuridad de nuestras mucosas y tejidos.

Además de todos los nutrientes antes mencionados, el medio que rodea a las bacterias debe proporcionar las condiciones físico-químicas apropiadas, que favorezcan el crecimiento bacteriano, tales como, temperatura, presión osmótica y pH.

Temperatura: La mayoría de las bacterias pueden crecer en un amplio rango de temperatura. Sin embargo, sólo presentan un estrecho rango de crecimiento óptimo. Delimita este rango una temperatura mínima de crecimiento y una máxima. Por debajo de la mínima la multiplicación se deteriora. Se sabe que la síntesis proteica es un proceso muy sensible a bajas temperaturas. Por sobre la temperatura máxima se produce muerte bacteriana debido a coagulación y denaturación de proteínas.

La temperatura de crecimiento es un rango taxonómico muy importante, pudiéndose clasificar a las bacterias según su óptimo térmico en tres grandes grupos:

Psicrófilas	10 - 20°
Mesófilas	20 - 40°
Termófilas	50 - 60°

La mayoría de las bacterias patógenas para la especie humana, se encuentra en el grupo de las mesófilas, pero existen algunas especies psicrófilas que pueden llegar a producir patologías, como es el caso de *Listeria monocytogenes*.

pH: En el interior de la bacteria siempre el pH es neutro, lo que nos demuestra el eficiente sistema de membrana de las bacterias. La mayoría de las bacterias puede soportar cambios entre 3 y 4 unidades de pH. Se puede agrupar a las bacterias en tres grupos según el pH: alcalófilas, neutrófilas y acidófilas. La mayoría de las bacterias son neutrófilas. Excepciones notables son *Lactobacillus* spp, microorganismo acidófilo que crece a pH = 4.5 y *Vibrio cholerae*, un alcalófilo que puede vivir a pH 9.

Presión osmótica: En general las bacterias soportan un amplio rango de presiones, debido a la presencia de la pared celular que es una importante barrera. Si se coloca a las bacterias en un medio hipertónico, el H₂O sale de la bacteria y se produce el fenómeno de plasmólisis. Existen las bacterias halófilas extremas que soportan hasta un 30% de sales y las halófilas corrientes que soportan entre 2 a un 10% de concentración de sal, Ej.: *Staphylococcus aureus*.

METABOLISMO BACTERIANO

Se define como el conjunto de reacciones que se realizan en el interior de las células. Estas reacciones pueden ser de síntesis (anabólicas) y de degradación (catabólicas).

La mayoría de las reacciones en los organismos vivos no ocurren espontáneamente, sino que requieren la acción de un catalizador, el cual incrementa la velocidad de la reacción. Los catalizadores de las reacciones biológicas son proteínas llamadas enzimas. Las enzimas son altamente específicas para las reacciones que catalizan.

Las enzimas bacterianas pueden clasificarse según su lugar de acción en: endoenzimas y exoenzimas. Las endoenzimas, son aquellas enzimas que actúan en el interior de la célula. Ej. oxidasas, reductasas y transaminasas. Las exoenzimas, son enzimas que siendo también sintetizadas en el interior de la célula, para ejercer su función deben ser exportadas al medio extracelular en bacterias Gram (+) y al espacio periplásmico en las bacterias Gram (-). Su función principal es degradar macromoléculas, las que por su tamaño no atraviesan las capas superficiales de la célula procariótica.

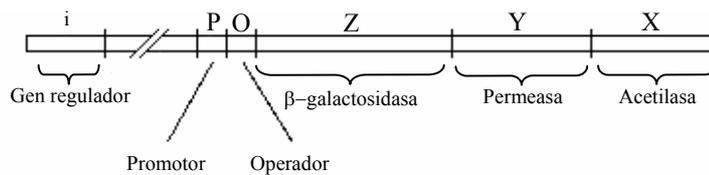
Las enzimas bacterianas, también pueden ser clasificadas considerando si su síntesis es o no modificada por el medio ambiente. De acuerdo a esto, las enzimas pueden ser constitutivas o inducidas. Las enzimas constitutivas son aquellas cuya síntesis es

independiente del medio externo. Se sintetizan siempre, Ej. enzimas que degradan la glucosa. En cambio, las enzimas inducidas son aquellas cuya síntesis depende de la presencia o ausencia del sustrato en el medio, Ej. β -galactosidasa, la cual actúa sobre la lactosa, sólo es sintetizada cuando existe lactosa en el medio (Figura 3-1). Las bacterias son metabólicamente eficientes ya que la mayoría de sus enzimas son inducidas.

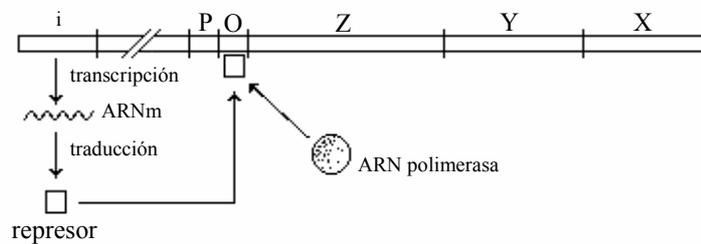
En un medio óptimo, la célula bacteriana regula sus vías metabólicas tan eficientemente que ningún intermediario es sintetizado en exceso. Si existe una fuente de carbono en exceso, se pone en juego toda la maquinaria enzimática para utilizarla. En forma opuesta, si un aminoácido está en exceso, se reprime su biosíntesis.

La regulación enzimática se realiza fundamentalmente en dos niveles: actividad enzimática (enzimas alostéricas, fosforilación) y síntesis enzimática (regulación de la expresión génica). En bacterias, la síntesis enzimática está regulada a través del sistema de operones, los cuales corresponden a unidades regulatorias génicas.

Organización Operón *Lac*



En ausencia del inductor



En presencia del inductor

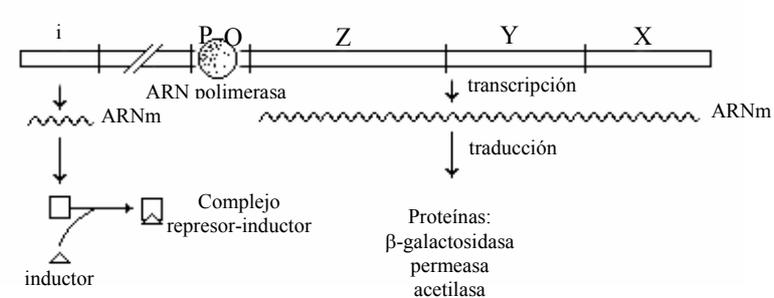


Figura 3-1: Operón *Lac*

Por ejemplo, se denominan bacterias Lactosa + a aquellas con la capacidad de sintetizar las enzimas necesarias para utilizar la lactosa, (β -galactosidasa, permeasa y acetil-transferasa). Las tres enzimas son codificadas en el operón *Lac* (Figura 3-1). Sobre este operón, actúa una proteína represora de la transcripción, codificada por el gen *i* (regulación génica negativa). Sin embargo, la proteína represora es inactivada por la presencia de lactosa en el medio, por lo que la expresión del operón *Lac* procede.

Una bacteria es Histidina + cuando posee el operón *His*. Este operón contiene los genes necesarios para la síntesis de este aminoácido. En este caso la proteína represora es activada por el aminoácido respectivo, constituyendo también un ejemplo de regulación génica negativa.

Por otro lado, las bacterias también poseen sistemas de regulación génica positiva. Es el caso de los operones relacionados con la utilización de la maltosa en *Escherichia coli*, cuya expresión depende de la presencia de una proteína activadora de la transcripción. Sin embargo, la proteína activadora no puede unirse a los operones *Mal* a menos que primero se una a la maltosa, que es el efector. En ausencia de maltosa, la proteína activadora no es capaz de interactuar con los operones *Mal* y por lo tanto estos no se expresan.

Para ejemplificar lo que ocurre al interior de una célula microbiana, con la incorporación de un determinado nutriente, vamos a destacar algunas etapas de la utilización de glucosa, el monosacárido más abundante de nuestro organismo. La mayoría de las bacterias patógenas son Glucosa +, a excepción de un grupo denominado bacilos Gram (-) no fermentadores (BGNNF). La glucosa entra a la célula por transporte activo como glucosa-6-P. Posteriormente, se reorganiza y se transforma en fructosa-1,6-difosfato. Luego, es partida en 2 triosas: gliceraldehído-3-P y dihidroxi acetona fosfato. Finalmente, se llega a piruvato, una encrucijada metabólica, igual a lo que sucede en nuestras células. Si el ácido pirúvico encuentra un ambiente sin O₂, sigue la vía glicolítica (Embden Meyerhof) hasta llegar a ácido láctico. Esta es la vía fermentativa que algunos géneros microbianos como *Staphylococcus* y *Streptococcus* utilizan para oxidar glucosa y a través de la cual obtienen energía, proceso denominado fosforilación a nivel de sustrato.

Por otro lado, en presencia de O₂, el ácido pirúvico se descarboxila oxidativamente, llegando a acetil coA, una molécula capaz de ingresar al ciclo de Krebs. Este ciclo, se lleva a cabo en el citosol, muy cerca de la membrana citoplasmática. Aunque no es el objetivo de este capítulo analizar sus diversas etapas, es importante destacar que como resultado de la oxidación de los compuestos, se liberan átomos de H₂, los que van a ser captados por moléculas especializadas, como el NAD, que forman parte de las moléculas transportadora de la cadena respiratoria.

En *E. coli*, se han encontrado moléculas transportadoras similares a las presentes en mitocondrias. Estas moléculas están ubicadas de tal manera en la membrana citoplasmática que se produce una dirección vectorial de electrones. Por otra parte, coexisten moléculas que sólo transportan electrones (FAD y citocromos) y las restantes que llevan electrones y protones. Los protones que no son transportados son expulsados al exterior de la membrana citoplasmática, creando un potencial de membrana de dos componentes: pH y eléctrico.

Debido a este potencial, los protones son capaces de ingresar por el complejo ATPasa, al interior de la célula, proporcionando la energía para que el ADP se fosforile y se transforme en ATP. Este mecanismo se conoce con el nombre de fosforilación oxidativa (Figura 3-2).

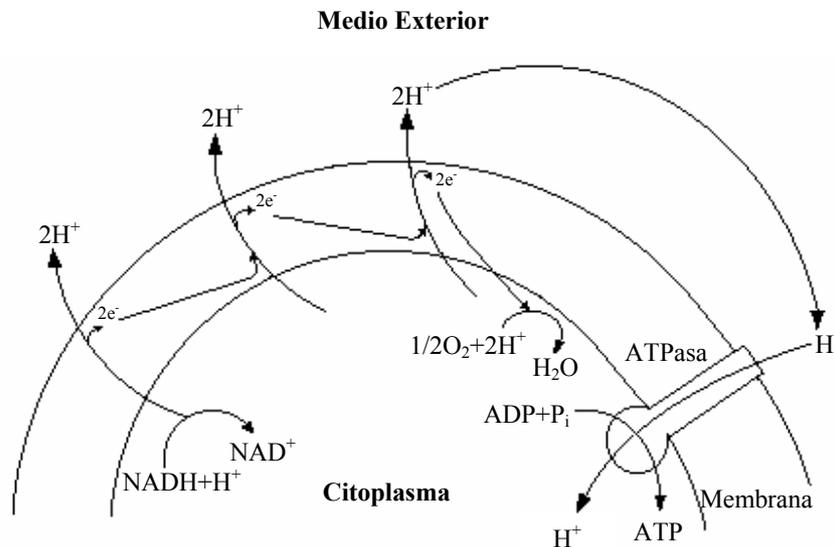


Figura 3-2: Cadena transportadora de electrones en la respiración y su relación con la generación de ATP.

Todos los seres vivos son capaces de sintetizar ATP por estos dos mecanismos: fosforilación oxidativa y fosforilación a nivel de sustrato. Las bacterias no constituyen una excepción a esta regla.

En la célula humana, el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria es siempre el O_2 . En las bacterias, el aceptor final puede ser O_2 , nitratos, sulfatos, o sustancias orgánicas. Esta capacidad de cambiar el aceptor final de electrones permite clasificar a las bacterias en tres grupos: aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos.

Aerobios estrictos : Son aquellas bacterias en que el aceptor final de electrones es el O_2 . Ej. *Mycobacterium tuberculosis*.

Anaerobios estrictos : Son aquellos microorganismos en que el aceptor final es una molécula inorgánica, como SO_4 o NO_3 . No utilizan O_2 y más aún éste es tóxico, ya que carecen de la capacidad de sintetizar catalasa, superóxido dismutasa. Ej. *Clostridium perfringens*.

Anaerobios facultativos: Pueden vivir con O_2 y sin O_2 . Si están en un medio con O_2 (aerobio), lo utilizan como aceptor final de electrones, forman ATP por fosforilación oxidativa. Pero si las condiciones del medio cambian y se termina el O_2 , estos microorganismos son capaces de cambiar todo su patrón enzimático relacionado con la respiración. Se ha comprobado que *E. coli* es capaz de sintetizar 50 enzimas nuevas en pocos minutos para seguir la vía anaeróbica. También en

el grupo de los anaerobios facultativos se ubican la mayoría de las bacterias patógenas para la especie humana, lo que implica una ventaja biológica muy importante para las bacterias en su capacidad de multiplicación tanto *in vitro*, como *in vivo*.

Dentro de las bacterias aerobias cabe mencionar aquellas que si bien pueden utilizar el oxígeno, sólo lo toleran cuando su concentración es más baja que la del aire (<21%), usualmente por su limitada capacidad de respirar o porque contienen alguna molécula o enzima sensible al oxígeno. Éstas se denominan **bacterias microaerófilas**, como por ejemplo *Campylobacter* spp.

Otro grupo interesante corresponde a las **bacterias capnofílicas**, las cuales para crecer en forma óptima necesitan de elevadas concentraciones de CO₂, por ejemplo *Haemophilus* spp y *Neisseria* spp.

La fermentación es un tipo de metabolismo anaeróbico, conocido por el hombre desde épocas remotas (fermentación del pan y el vino). La fermentación, se define como un proceso en que el dador de electrones es una molécula orgánica, generalmente un azúcar, y el receptor de electrones también es orgánico, generalmente un derivado de la molécula oxidada. No necesita O₂, no hay moléculas transportadoras de electrones, formándose ATP por fosforilación a nivel de sustrato. La mayoría de las bacterias patógenas para el hombre son capaces de seguir la vía fermentativa. Según el producto final tenemos fermentación láctica (*Streptococcus* y *Staphylococcus*) y fermentación ácido mixta (Enterobacterias).

MULTIPLICACIÓN

Como resultado del metabolismo bacteriano, el microorganismo crece y se multiplica. La multiplicación implica el aumento del número, pero no del tamaño bacteriano. Estas, se reproducen normalmente por fisión binaria. El primer paso es la duplicación del ADN. Posteriormente, la membrana citoplasmática y la pared celular se invaginan, separando en dos regiones el ADN cromosómico. Finalmente, las paredes en crecimiento se unen formando dos células individuales, cada una de las cuales es esencialmente idéntica a la célula parental. La mayoría de las bacterias se divide cada 20 minutos (tiempo de gestación). El bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*) constituye una excepción, ya que se divide cada 24 hrs.

Si en el laboratorio se tiene un cultivo puro bacteriano, en condiciones óptimas de desarrollo, uno puede predecir el aumento y disminución de la población microbiana. Al hacer un recuento de las bacterias vivas en diferentes intervalos de tiempo y trazar un gráfico, podemos obtener una curva de crecimiento con cuatro etapas o fases características. Fase de latencia, logarítmica o exponencial, estacionaria y de regresión o muerte (Figura 3-3).

Latencia : La fase de latencia dura aproximadamente 4 hrs. No hay crecimiento visible y de hecho puede haber una reducción en el número de bacterias. Es un período de adaptación, en que las bacterias tienen una gran actividad metabólica, pero no se dividen. (Figura 3-3: A-B).

- Logarítmica** : Después de 6 hrs, aproximadamente, de haber sembrado las bacterias en un medio óptimo, las bacterias comienzan a dividirse en forma constante y máxima. El número de bacterias aumenta en progresión geométrica y la resultante es una línea recta ascendente. Este período termina más o menos a las 12 hrs, debido a la disminución de los nutrientes disponibles. (Figura 3-3: C-D).
- Estacionaria** : Debido a la acumulación de desechos metabólicos y disminución de los nutrientes, la actividad metabólica decae. Las bacterias se dividen con menor frecuencia y el número total de bacterias vivas permanece constante, puesto que el número de muertes se equilibra con el de multiplicación. En la mayoría de las bacterias esta fase se produce entre las 18 a 24 hrs. (Figura 3-3: E-H).
- Regresión** : En esta fase, conocida también como fase de muerte, las bacterias dejan de multiplicarse y mueren con el tiempo, debido al término de nutrientes, acumulación de material de desecho y disminución del espacio físico. No todas las bacterias del cultivo se encuentran en esta fase al mismo tiempo, por lo tanto se representa como una pendiente, que no llega a 0. Esta curva sólo se produce en condiciones de laboratorio.

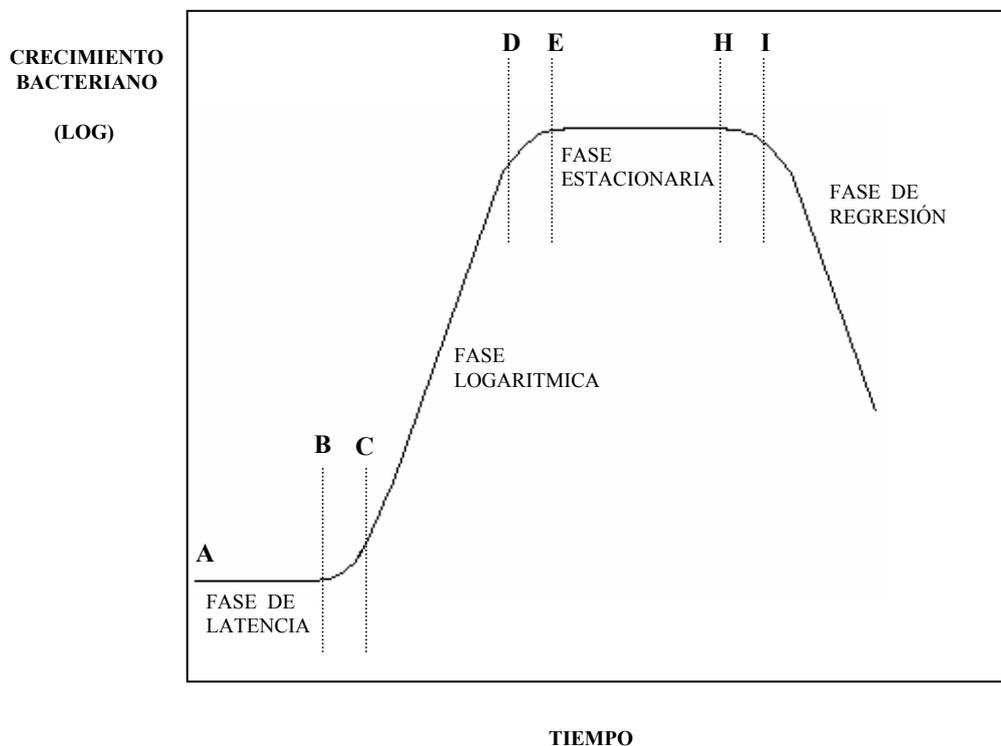


Figura 3-3: Curva de crecimiento. Eje Y, logaritmo del crecimiento bacteriano en función del tiempo (Eje X).

BIBLIOGRAFÍA

- Brooks GF, Butel JN, Ornston NL, Jawetz E, Melnick J, Adelberg E.** 1992. Microbiología Médica. Ed. El Manual Moderno. S.A. de C.V. México D.F.
- Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E.** 1978. Role of iron in bacterial infection. *Curr Topics Microbiol Immunol* 80:1
- Davis B, B, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg H: Microbiology.** 1990. Fourth Ed. J.B. Lippencott Company Phyladelphia.
- IngledeW WJ, Poole RK.** 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 48:222.
- Joklik WK, Willett HP, Amos BD, Wilfert CM.** 1994. En *Zinsser Microbiología*. 20^a Ed. Panamericana, Buenos Aires.
- Madigan M, Martinko J and Parket J.** 1998. *Brock Biología de los Microorganismos*. 8^a Ed. Pearson Educación S.A. Madrid, España.
- Murray P, Kobayashi G, Pfaller M. and Rosenthal K.** 1997. Metabolismo bacteriano pp: 17-27. En *Microbiología Médica*. 2^a Ed. Harcourt Brace de España S.A. Madrid, España.
- Tortora GJ, Funke RB, Case CL.** 1993. *Introducción a la Microbiología* 3^{era} Ed. Acribia, S.A. España.