

UNIDAD III: TAXONOMÍA Y CRECIMIENTO BACTERIANO

La taxonomía es la ciencia de la clasificación y está constituida por dos subdisciplinas: la identificación y la nomenclatura.

Siguiendo el sistema binomial de nomenclatura, a todos los organismos (incluidas las bacterias) se les asigna un nombre de género y otro de especie. Los nombres de especies y géneros son derivados griegos o latinos de alguna propiedad descriptiva apropiada a la especie en cuestión, y se escriben en cursiva. Una particularidad en taxonomía microbiana es el concepto de cepa que, en general, no se utiliza en organismos superiores. Debido a que los microorganismos se dividen por fusión binaria, una **cepa** es una población genéticamente idéntica obtenida a partir de una sola célula.

Cuando se aísla un nuevo organismo debe publicarse la descripción y el nombre propuesto en la publicación oficial de registro para la taxonomía y clasificación de los microorganismos: International Journal of Systematic Bacteriology (IJSB), y depositarse en una colección de cultivos aprobada por la World Intellectual Property Organization (WIPO). Los microorganismos depositados se conservan congelados o liofilizados y constituyen la “**cepa tipo**” de la nueva especie. El IJSB publica periódicamente la lista de nuevos nombres aprobados en el “Manual Bergey’s”, uno de los principales tratados de taxonomía de los procariotas que está permanentemente actualizado (on line). Este manual es un componente de información clásica y molecular sobre todas las especies reconocidas de procariotas y contiene claves dicotómicas que son útiles para la identificación.

Taxonomía bacteriana convencional

La taxonomía bacteriana convencional consiste en clasificar las bacterias mediante: a) características morfológicas (carácter Gram, esporas, flagelos, etc.), b) tipo de metabolismo (QOH, QLA, FLA, etc.), c) características bioquímicas (sustratos y productos metabólicos), d) tolerancia a condiciones ambientales (diferentes gases, temperatura, pH, etc.), e) sensibilidad a los antibióticos, f) patogeneidad, g) relaciones simbióticas, h) características inmunológicas, e i) hábitat de origen.

Para identificar un organismo se sigue una secuencia desde las características más generales a las más específicas mediante claves dicotómicas hasta llegar a definir la especie. Esta metodología de identificación se emplea de rutina en microbiología clínica, pero a causa de la gran variabilidad y adaptación de los microorganismos en ambientes naturales resulta incompleta cuando se trabaja en condiciones de campo.

Ejemplo de una clave dicotómica utilizada en taxonomía bacteriana convencional

Eubacterias: Unicelulares, pared rígida, no fotótrofas.

- Cocos
 - (Gram+): Lactobaciláceas (bacterias del ácido láctico).
Streptococcus, Leuconostoc, Micrococcus.
 - Micrococáceas
 - Aerobios: *Sarcina, Micrococcus.*
 - Anaerobios: *Sarcina, Methanosarcina, Thiosarcina.*
 - (Gram-): Neisserláceas.
 - Aerobios: *Neisseria*
 - Anaerobios: *Veillonella*
- Bacilos
 - No formadores de esporas
 - (Gram+)
 - Aerobios-----*Corynebacterium, Arthrobacter.*
 - Anaerobios-----Propionibacteriáceas, Lactobaciláceas.
 - (Gram-)
 - Flagelación polar-----*Pseudomonas, Acetomonas, Acetobacter,*
Nitrobacteriáceas, Tiobacteriáceas.
 - Flagelación peritrica-----Enterobacteriáceas, Azotobacteriáceas,
Rizobiáceas.
 - Inmóviles-----Parvobacteriáceas, Bacteroidáceas.
 - Formadores de esporas (Baciláceas)
 - Aerobios-----*Bacillus*
 - Anaerobios-----*Clostridium, Desulfomaculum.*
- Espirilos (Espiriláceas)-----*Spirillum, Vibrio, Desulfovibrio.*

Bacterias próximas a las Eubacterias:

- Bacterias fotótrofas: con pigmentos fotosintéticos, luz como fuente de energía.
Bacterias purpúreas del azufre (Tiorrodáceas).
Bacterias purpúreas (Atiorrodáceas).
Bacterias verdes del azufre (Clorobiáceas).
- Bacterias pedunculadas: con pedunculos.
- Bacterias con vaina: vainas tubulares (Clamidobacterias).
- Actinomicetes: con micelios.
- Rickettsias: parasitismo obligado.

Bacterias que se diferencian de las Eubacterias por características importantes:

- Espiroquetas: pared celular delgada y flexible, movilidad por contracción de filamento axial.
- Bacterias reptantes: móviles pero nunca por flagelos.
- Mixobacterias: pared celular delgada y flexible.
- Micoplasmas: sin pared celular.

Taxonomía molecular

La taxonomía molecular consiste en clasificar a los organismos mediante las características de las principales biomoléculas orgánicas, particularmente los ácidos nucleicos. Tiene la ventaja de ser muy específica y sensible, por lo que en la actualidad es una metodología excluyente para la identificación taxonómica. Los métodos biomoleculares más utilizados son: a) composición de bases del ADN, b) secuenciación de nucleótidos, y c) hibridación del ADN.

Composición de bases del ADN

Consiste en establecer la proporción de las bases del ADN, expresadas en porcentajes moleculares (mol%) de Guanina+Citosina (G+C). Este método se fundamenta en que la cantidad relativa de G+C es característica para cada especie y que existe escasa variación en la cantidad de G+C dentro de un mismo grupo taxonómico (entre 3-5%). Además, existe una cierta correlación entre la composición de bases y el tipo fisiológico, por ej. los organismos de respiración aeróbica tienen una proporción de G+C entre 60-75% mientras que los organismos fermentadores poseen valores muy inferiores.

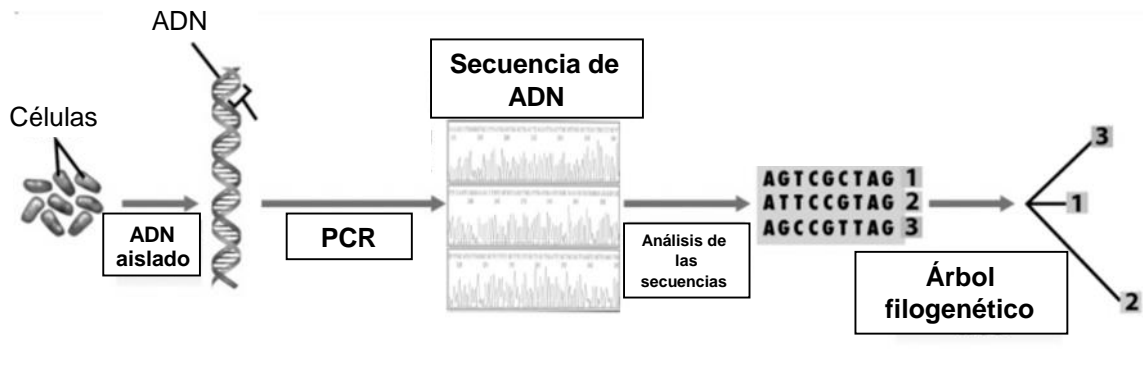
Sin embargo, este método tiene algunas limitaciones porque lo que define las características de un organismo no es la cantidad de algunas bases sino la secuencia de las bases dentro del ADN. La determinación del porcentaje de G+C aporta información sobre la proporción de cada nucleótido del ADN de un organismo, pero no revela ningún dato sobre la secuencia de esos nucleótidos. Dos organismos pueden tener idéntica proporción de bases y sin embargo no estar relacionados entre sí (ni taxonómicamente ni filogenéticamente), ya que es posible tener secuencias diferentes con una misma composición global de bases del ADN. Por ejemplo, las especies del género *Bacillus* presentan un amplio rango de porcentaje de G+C, mientras que bacterias de diferentes géneros dentro de las Enterobacterias tienen proporciones de G+C prácticamente idénticas.

Secuenciación de nucleótidos

El método consiste en establecer el orden en que están colocados los nucleótidos dentro de las moléculas de ácidos nucleicos, basándose en el proceso biológico de replicación del ADN, donde se utiliza un cebador o "primer" para comenzar la amplificación. Luego de la amplificación se realiza una electroforesis para obtener un patrón de bandas del que se deduce la secuencia del ADN introducido. Esta información es clave para la diferencia entre organismos.

Metodológicamente se trabaja con trozos cortos (pocos nucleótidos) tanto de ADN como ARN. Para la taxonomía de bacterias las moléculas más utilizadas son la fracción de 16S del ARN ribosómico (1500 nucleótidos) y el ADN de los plásmidos. Este último es muy importante para organismos de interés funcional como los fijadores de N₂, cuya enzima nitrogenasa se informa en el ADN de los plásmidos.

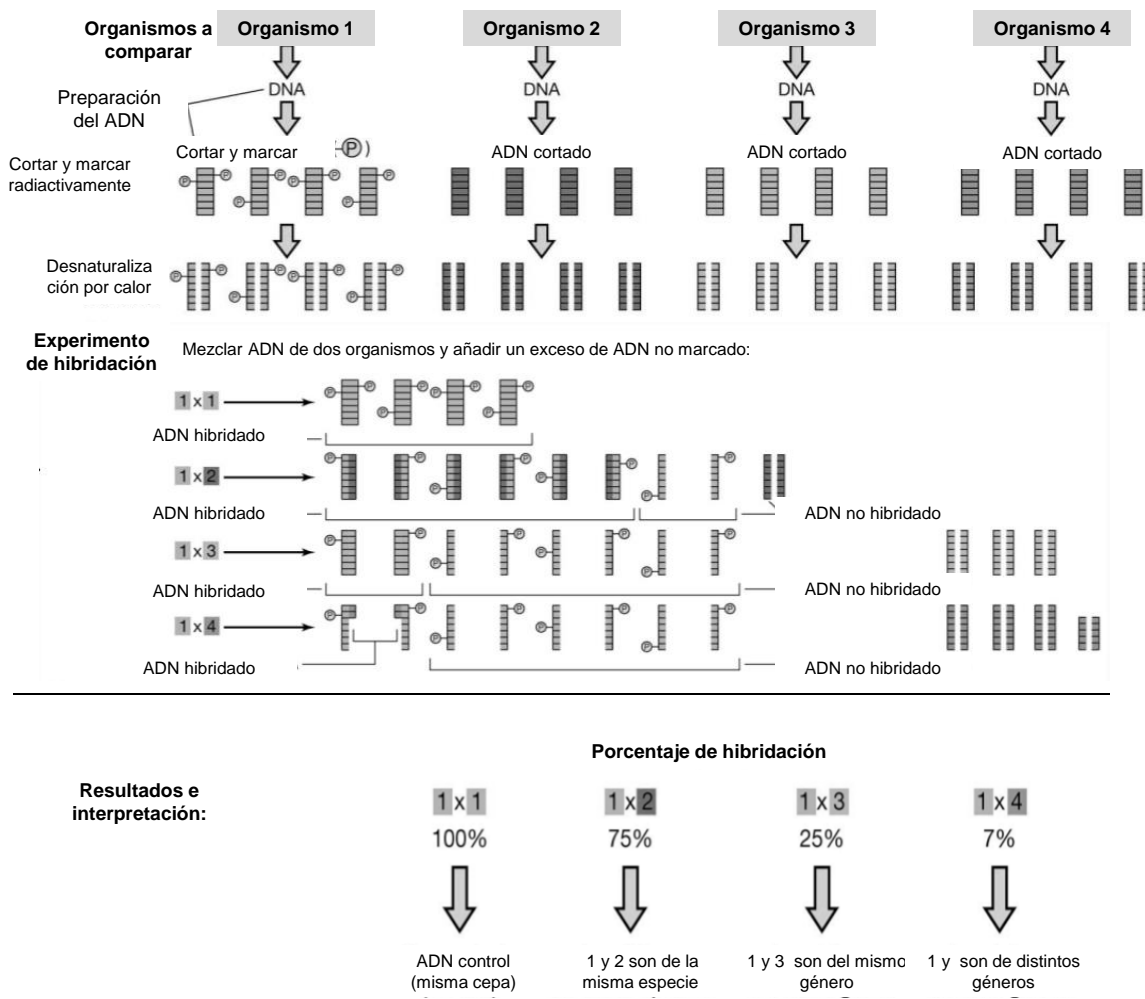
Para establecer la identificación de los microorganismos se aplica un programa de similitud genética entre las secuencias de los nucleótidos analizados y los de otras especies conocidas. En la actualidad, toda la información sobre las secuencias de nucleótidos en especies identificadas está disponible en la Web en lo que se conoce como “banco de genes”.



Hibridación de ADN

La hibridación es la construcción artificial de ADN bicatenario a partir de dos monocatenarios y por complementariedad de bases. El método consiste en poner en contacto moléculas monocatenarias de ADN de organismos diferentes para establecer su similitud a través del porcentaje de hibridación que se produce. Generalmente, el ADN de una cepa desconocida se pone en contacto con trozos de moléculas de una secuencia de nucleótidos conocida denominados “primers”.

Este es un método muy versátil que permite estudiar el grado de relación genética entre dos ADN. La proporción de similitud genética que se acepta para asignar el nivel taxonómico a dos organismos es: a) 99% o 100% pertenecen a la misma cepa (clon), b) mayor de 60% pertenecen a la misma especie; c) mayor de 20% pertenecen al mismo género, d) entre 1 y el 5% pertenecen a géneros no relacionados.



CRECIMIENTO BACTERIANO

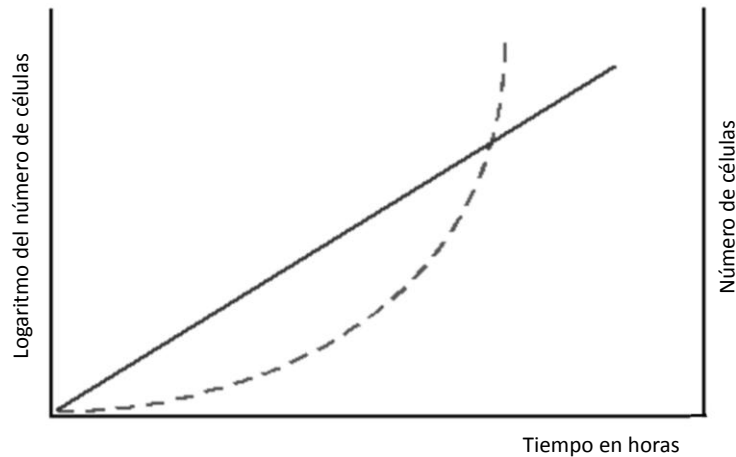
El crecimiento bacteriano se establece a través del incremento en el número de células de una población y por el consiguiente aumento de la biomasa microbiana.

La **velocidad de crecimiento** es el cambio en el número de células o masa celular por unidad de tiempo. El tiempo requerido para que, a partir de una célula se formen dos células, se denomina **tiempo de generación**. El tiempo de generación varía ampliamente entre los microorganismos. Muchas bacterias tienen tiempos de generación de 1-3 horas, pero las de crecimiento rápido pueden hacerlo en 10 minutos, mientras que otras pueden tardar días.

Las bacterias tienen crecimiento exponencial debido a que el número de células se duplica cada cierto período de tiempo. Si el crecimiento exponencial se grafica en ejes de escala aritmética, se obtiene una curva en la cual se va incrementando progresivamente la pendiente, lo que dificulta el análisis sobre la

velocidad de crecimiento. Generalmente, se grafica el crecimiento bacteriano en escala logarítmica (base 10), que permite visualizar directamente el tiempo de generación.

Una característica del crecimiento exponencial es que la velocidad de incremento en el número de células es lenta inicialmente, para después incrementarse constantemente en una auténtica explosión del número de células



Cálculo de tiempos de generación

El incremento de número de células que tiene lugar en un cultivo creciendo exponencialmente es una progresión geométrica del número 2. Al dividirse dos células (para dar cuatro) podemos expresar esto como $2^1 \rightarrow 2^2$. Al dividirse 4 para dar 8 se puede poner como $2^2 \rightarrow 2^3$ y así sucesivamente. Debido a la progresión geométrica, hay una relación directa entre el número de células iniciales y las finales a un tiempo determinado:

$$N = N_0 2^n$$

Donde **N** = número final de células, **N₀** = número inicial de células y **n** = número de generaciones que han ocurrido durante el período de fase exponencial.

El tiempo de generación **g** de la población celular se calcula como **t/n**, donde **t** son las horas o minutos de crecimiento exponencial. Conociendo las poblaciones final e inicial es posible calcular el número de generaciones y a su vez el tiempo de generación.

Para expresar la ecuación **N = N₀ 2ⁿ** en términos de **n** son necesarias las siguientes transformaciones:

Se aplica logaritmo

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

y se despeja el número de duplicaciones

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

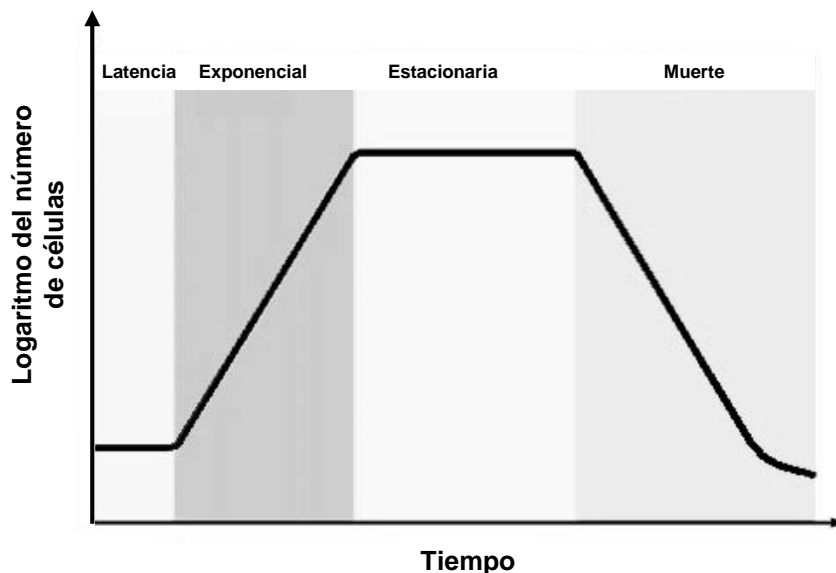
También se puede calcular la velocidad de duplicación (v), o sea, el número de duplicaciones en el tiempo, que es la inversa al tiempo de generación: n/t ó $1/g$.

Los tiempos de generación son a menudo indicadores del estado fisiológico de una población microbiana y es muy utilizado en microbiología industrial para el monitoreo del proceso de obtención de diferentes productos.

Curvas de crecimiento

El crecimiento de una población no presenta un crecimiento constante en el tiempo. Generalmente la velocidad de duplicación del número de células es muy lenta inicialmente, después se incrementa constantemente y posteriormente disminuye. Por tal motivo la gráfica de la curva de crecimiento presenta diferentes fases:

- 1- fase de latencia.
- 2- fase exponencial.
- 3- fase estacionaria.
- 4- fase de muerte.



1- Fase de latencia

Cuando se traslada una alícuota de una población microbiana a un medio de cultivo nuevo, no ocurre crecimiento inmediatamente, sino después de cierto tiempo que se llama **fase de latencia**. Esta fase puede ser más larga o más corta dependiendo de muchos factores. Por ej., será larga si el cultivo iniciador es viejo, si la composición del medio fresco es diferente al original, etc. La fase de latencia se produce porque los organismos deben adaptarse a las nuevas condiciones antes de reproducirse. Generalmente si el cultivo es viejo o en latencia, las células deben comenzar a sintetizar enzimas o factores de crecimiento que ya no poseen. Similarmente, si el medio tiene una composición diferente la célula debe sintetizar las enzimas necesarias para degradar los nuevos compuestos. Con fines prácticos industriales, se persigue que esta fase sea lo más corta posible para tener mayor eficiencia y productividad del cultivo.

2- Fase exponencial

Es la verdadera fase de duplicación celular. La pendiente de la **fase exponencial** depende de las características genéticas de los microorganismos y de las condiciones del cultivo. En general, los procariontes crecen más rápidamente que los eucariotes y los eucariotes pequeños lo hacen más rápidamente que los grandes. Si en la industria se persigue la obtención de gran cantidad de células (por ej., producción de inoculantes), se manejan las condiciones de producción tendiendo a que la fase exponencial sea larga y de mucha pendiente (medio altamente nutritivo, control del pH, temperatura y aireación, etc.).

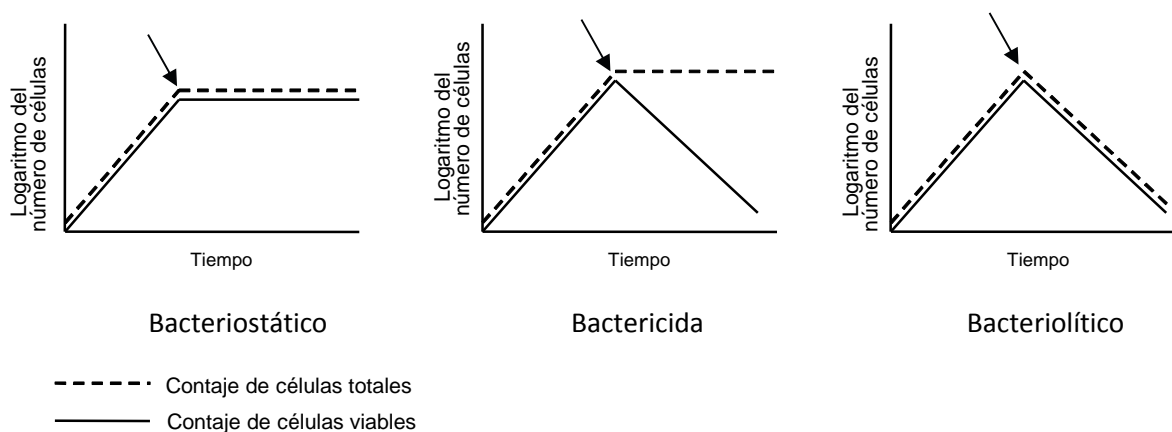
3- Fase estacionaria

Se denomina **fase estacionaria** al periodo de tiempo donde no se detecta aumento o disminución en el número de células. Generalmente esta fase se produce por agotamiento de los compuestos nutritivos del medio de cultivo o por la producción de sustancias metabólicas que inhiben el crecimiento celular (por ej., producción de ácido láctico que baja el pH). Que no se detecte crecimiento no quiere decir que las células no se dividan, sino que la tasa de muerte y la de división celular están balanceadas. Cuando se pretende obtener un producto metabólico, se manejan las condiciones para que la fase exponencial sea corta y de mucha pendiente y que el cultivo entre en fase estacionaria rápidamente, donde se registra la mayor concentración del producto buscado.

4- Fase de muerte

Cuando se desestabiliza el balance entre muerte y duplicación y se producen más muertes que divisiones, comienza la **fase de muerte** del cultivo. Esta fase tiene una pendiente exponencial negativa, que puede ser de la misma magnitud que la fase de crecimiento exponencial. En la práctica industrial esta fase es importante

para evaluar el desarrollo de productos desinfectantes y esterilizantes, que pueden ser: a) bacteriostáticos, b) bactericidas o c) bacteriolíticos. El efecto bacteriostático es el que detiene el crecimiento pero no mata a la célula. Los agentes bactericidas matan a la célula pero no se produce la lisis o ruptura de la célula, mientras que los bacteriolíticos matan a la célula mediante la lisis lo que se observa como una disminución en el número de células o de la turbidez después de añadir el agente.



Tres tipos de acción de agentes antimicrobianos. En el tiempo indicado por la flecha se añadió una sustancia inhibidora del crecimiento a un cultivo en fase exponencial de crecimiento.

Productos microbiológicos de carácter industrial

Los productos industriales obtenidos por procesos del metabolismo bacteriano son de dos grandes grupos: alimenticios y farmacéuticos. En la actualidad también existe un amplio desarrollo para la obtención de productos para la agricultura como son los inoculantes y los bioinsecticidas como el *Bacillus turigiensis*. Dentro de los productos alimenticios se incluyen los de consumo directo como pan, cerveza, vino, etc. y los insumos para la industria alimenticia (enzimas, alcoholes, ácidos, etc.).

Los productos farmacéuticos más importantes son los antibióticos. El descubrimiento y producción de los antibióticos fue un hito en la lucha por la salubridad humana. Los antibióticos son productos secundarios del metabolismo de algunos microorganismos, sintetizados para poder competir en el suelo frente a las bacterias. Por tal motivo no afectan a las células eucarióticas y pueden ser utilizados en organismos superiores sin dañar las células del enfermo. Los antibióticos típicos son: la penicilina (inhibe la síntesis de la pared celular de las bacterias) producida por el hongo *Penicillium* y la estreptomycinina (inhibe la síntesis de proteínas en bacterias) producida por el actinomicete *Streptomyces*. En la actualidad muchos antibióticos son sintetizados artificialmente y no a través de cultivos microbianos.

La producción de inoculantes es uno de los objetivos de la Microbiología Agrícola y será extensamente desarrollado en otras unidades.

Todos estos procesos microbiológicos industriales se basan en la potenciación de reacciones metabólicas que los microorganismos ya son capaces de llevar a cabo, con el fin de aumentar la producción del compuesto de interés.

Cultivos continuos

Para la producción industrial de cualquiera de los productos biológicos se han desarrollado tecnologías de alta precisión para evitar contaminaciones y optimizar el rendimiento. Los cultivos son realizados en equipos de fermentación especiales con condiciones controladas estrictamente.

Un cultivo continuo es esencialmente un cultivo de volumen constante, y para mantener los cultivos de manera continua en fase exponencial se han desarrollado equipos denominados quimiostatos, que consiste en evitar la fase estacionaria y de muerte mediante la incorporación de medio de cultivo fresco a medida que se va utilizando el sustrato original. Simultáneamente con la incorporación de medio fresco se retira el cultivo bacteriano ya crecido. Se denomina turbidostato cuando la incorporación de nuevo medio de cultivo se realiza según la tasa de crecimiento, evaluada por densidad óptica.

