

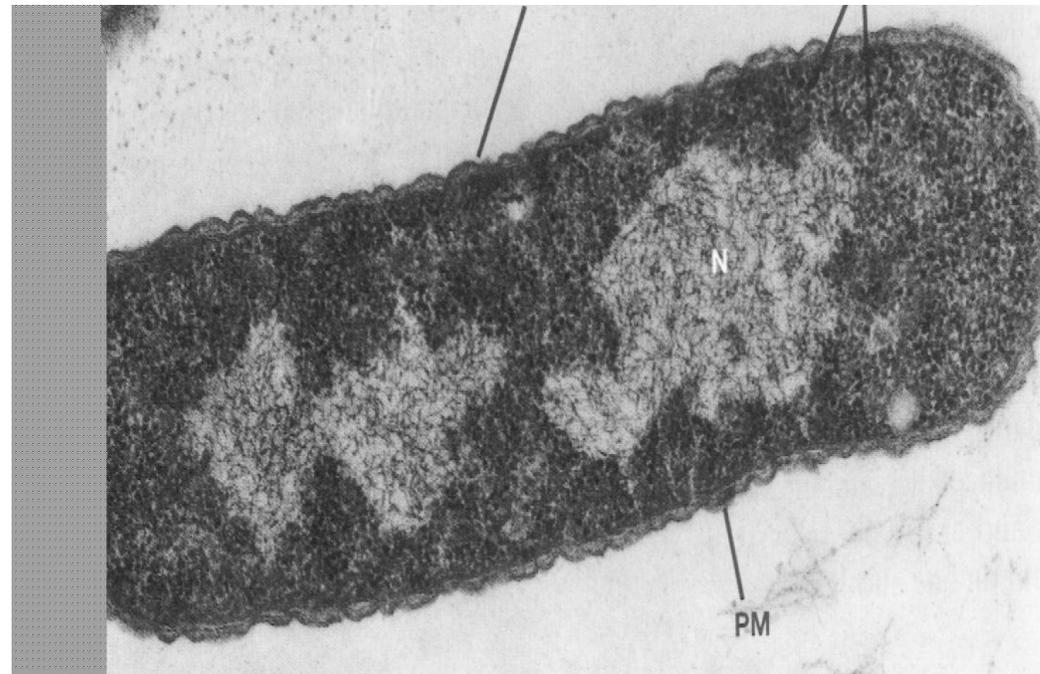
MICROBIOLOGÍA

UNIDAD III ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA CÉLULA PROCARIÓTICA

Organización de la célula procariota. Pared celular. Composición, estructura y función de la pared celular. Biosíntesis de peptidoglicano. Métodos empleados en la observación de las bacterias. Pared de bacterias Gram positivas, Gram negativas y arqueas. Relación entre estructura de la pared y propiedades de tinción de la célula procariota. Cápsulas microbianas: naturaleza, composición y funciones. Componentes externos a la pared: glucocálix y capa S. Formas sin pared. Flagelos, movilidad procariota y taxias. Otras estructuras superficiales, fimbrias y *pili*. Contenidos de la matriz citoplasmática: ribosomas, cuerpos de inclusión y vesículas de gas. Endosporas. El nucleoide. Principales mecanismos de transporte especializado en procariotas.

ESTRUCTURA CELULAR PROCARIOTA - ADN

- ❖ No tiene núcleo, y su ADN está en el citoplasma en la zona llamada “NUCLEOIDE”.
- ❖ El genoma es haploide, es una única molécula de ADN de doble cadena (circular).
- ❖ El genoma contiene 1,6 millones de pb en procariotas de vida libre, con 1.000-5.000 genes.
- ❖ Puede contener otros elementos genéticos no indispensables para la vida: plásmidos.
- ❖ Está rodeada por la membrana celular y cubiertas exteriores de naturaleza variable.



LA MEMBRANA CELULAR

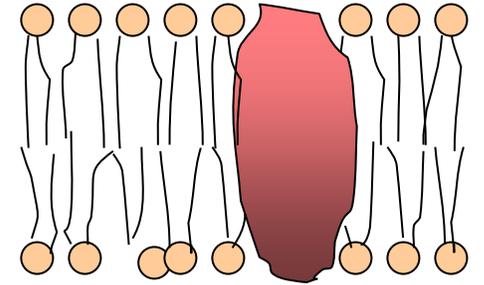


Funciones:

- Transporte selectivo de sustratos.
- Participa en la generación de energía y en la división celular.

Estructura:

- Bicapa fosfolipídica con proteínas embebidas; puede contener también hopanoides de estructura similar al colesterol.
- *en *Archaea*, membranas adaptadas a condiciones extremas: ÉTERES de alcohol isoprenoide, algunas son MONOCAPAS.



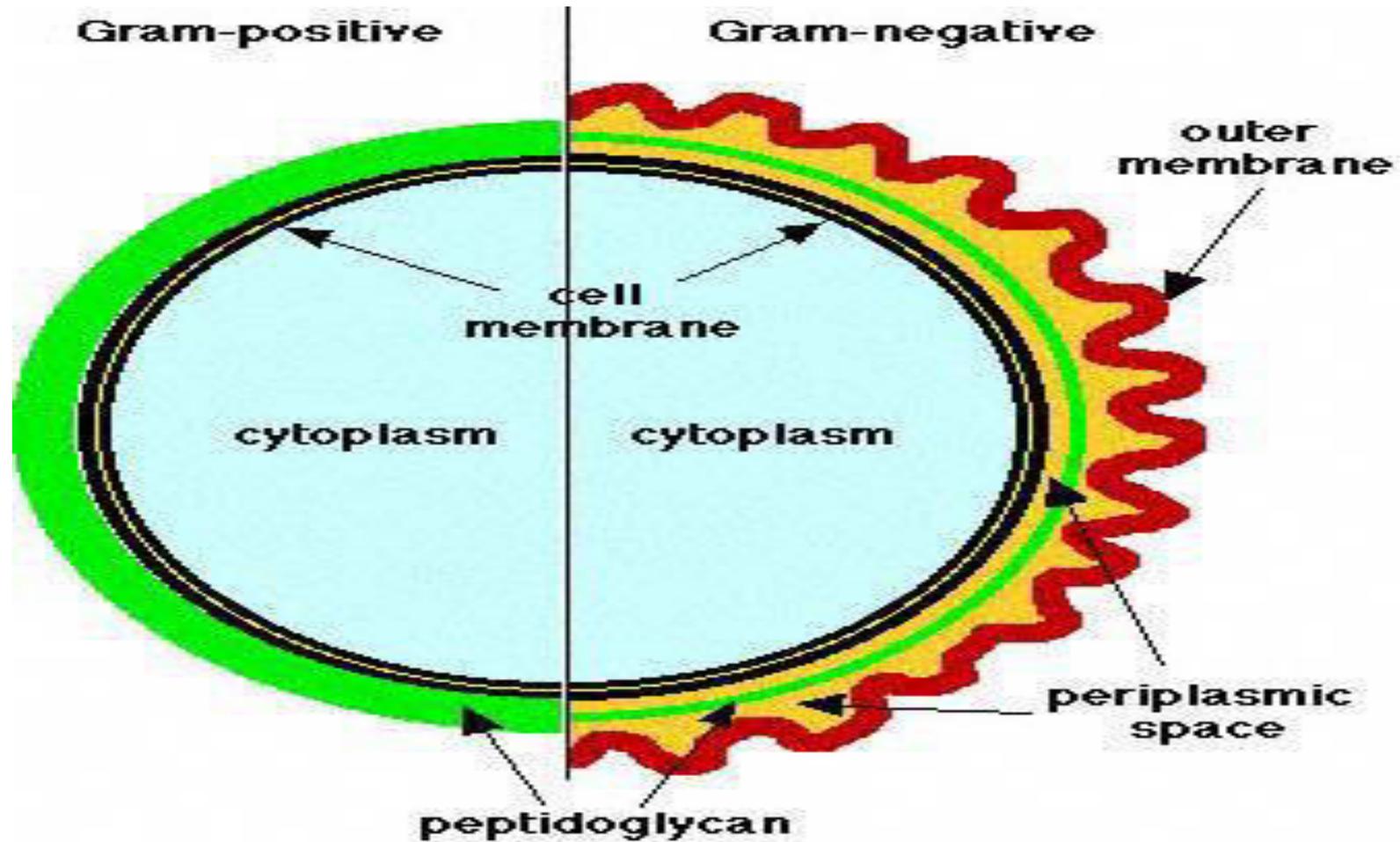
PAREDES CELULARES DE PROCARIOTAS

Debido a las actividades de los sistemas de transporte, el citoplasma de las células bacterianas contiene una alta concentración de solutos disueltos, lo que origina una notable presión osmótica equivalente a 2 atm en *Escherichia coli*, (\approx a la presión de un neumático).

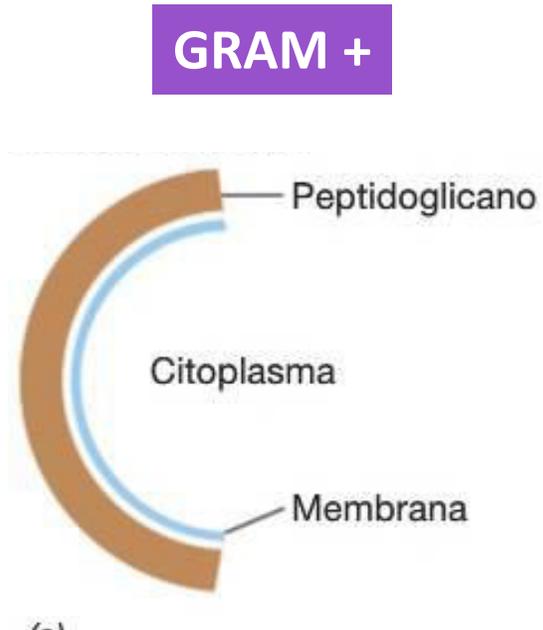


- ❖ Estructura para resistir estas presiones y evitar la lisis celular (10–40% peso bacteriano)
- ❖ Responsables de la forma y rigidez de la célula.
- ❖ Comunicación con el medio exterior.
- ❖ Puede estar involucrada en patogenicidad (LPS)
- ❖ Barrera contra ciertos agentes tóxicos (antibióticos β -lactámicos)

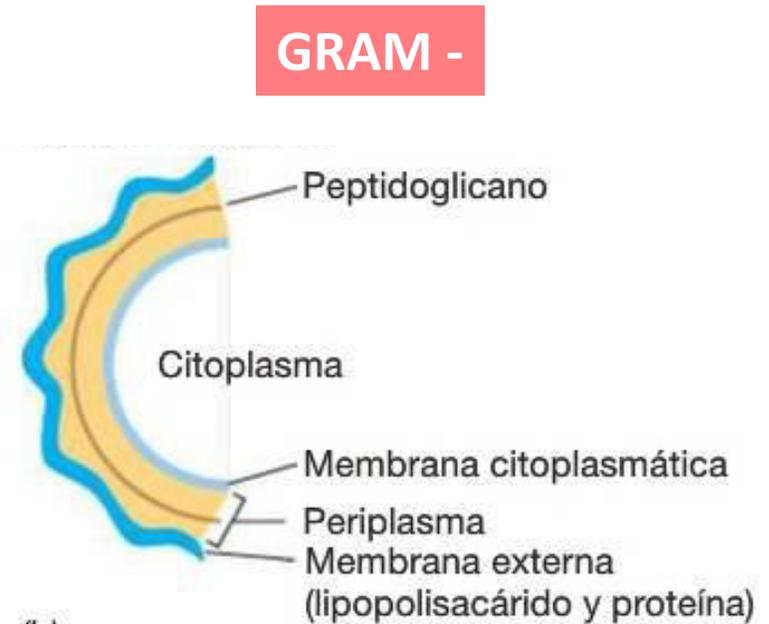
ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE LA PARED BACTERIANA



- ❖ Las bacterias se dividen en 2 grandes grupos, las gram + y las gram -
- ❖ La distinción inicial entre estos 2 tipos se basa en la tinción de Gram, pero la diferente reacción a esta tinción se basa en las diferencias que existen en la estructura de las paredes celulares.

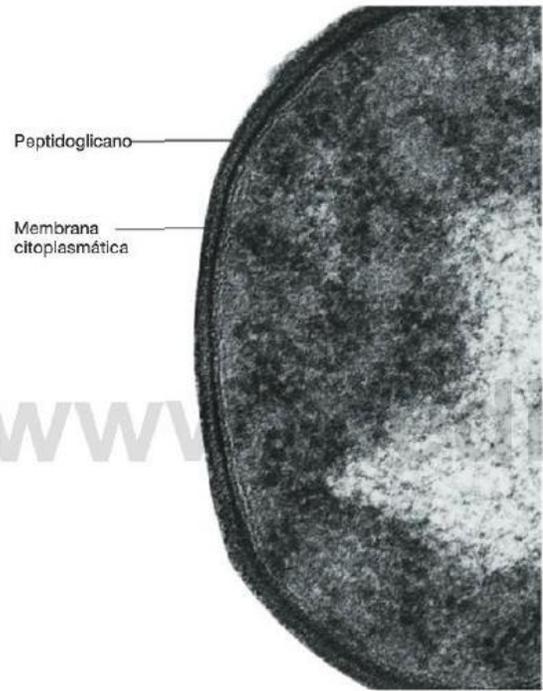


Ancha y formada fundamentalmente por un solo tipo de molécula

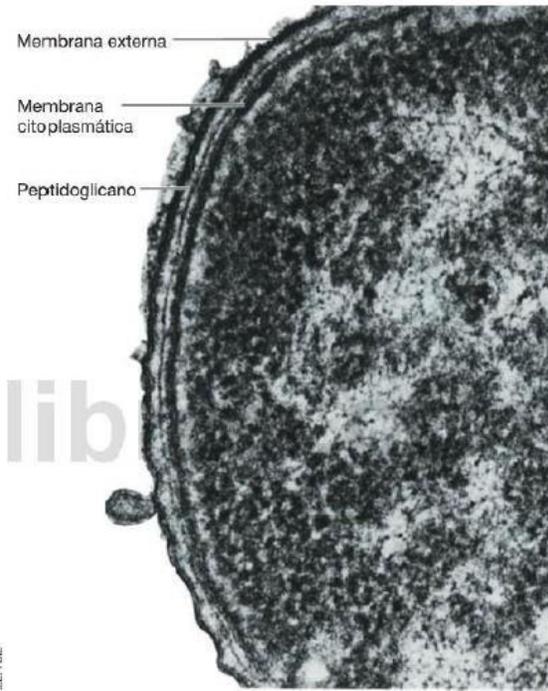


Compuesta por varias capas y bastante compleja

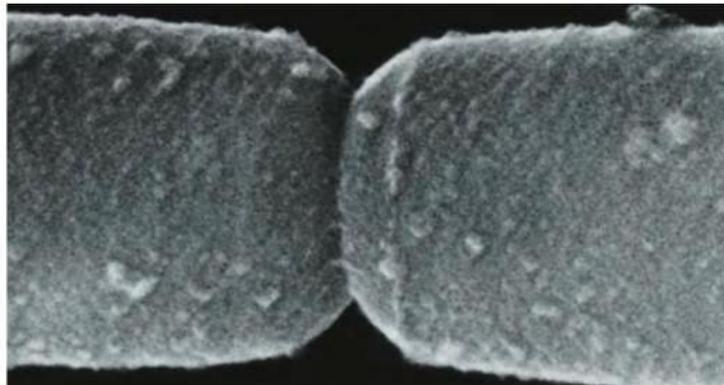
DIFERENTE TEXTURA SUPERFICIAL



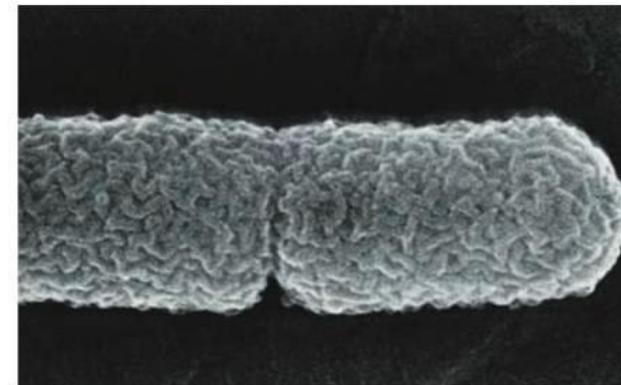
Arthrobacter crystallopoietes



Leucothrix mucor



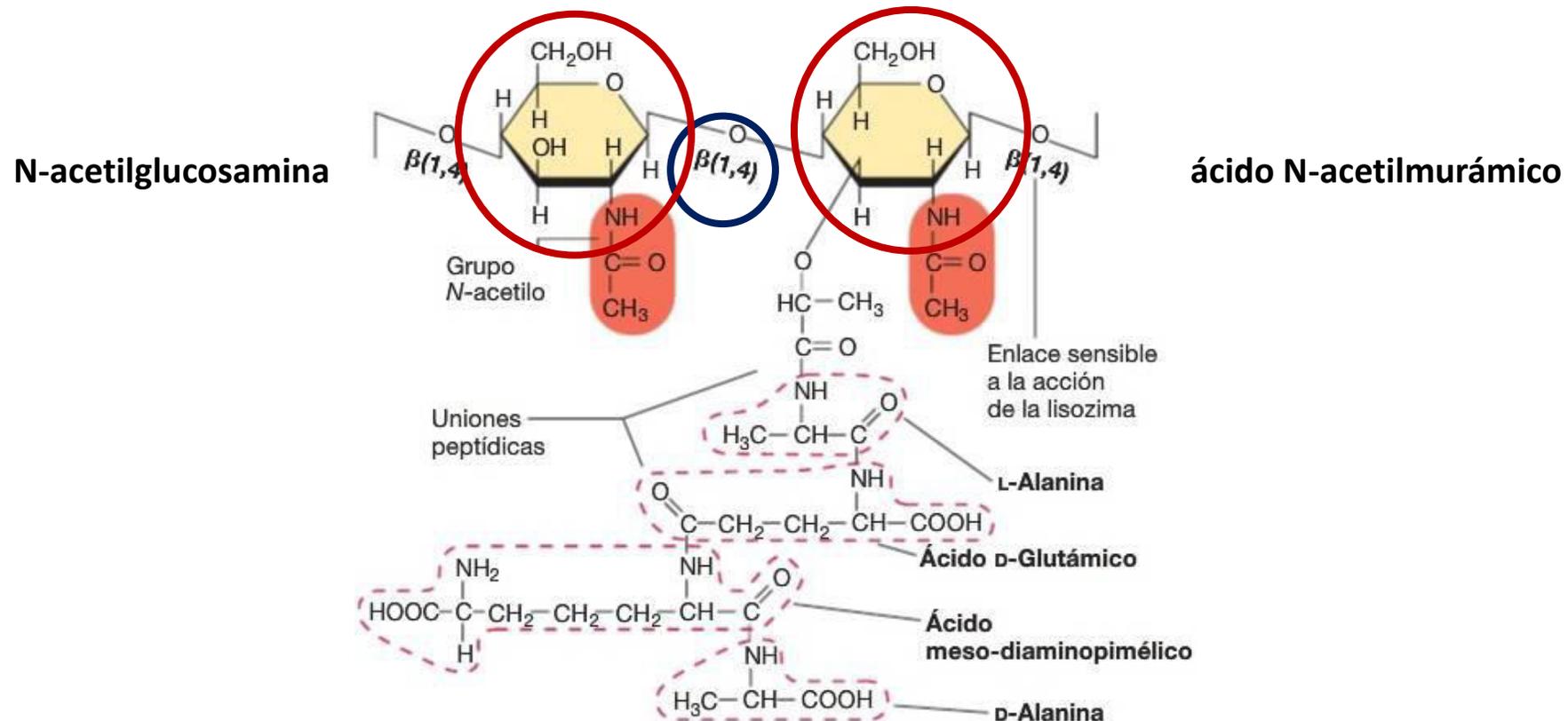
Bacillus subtilis



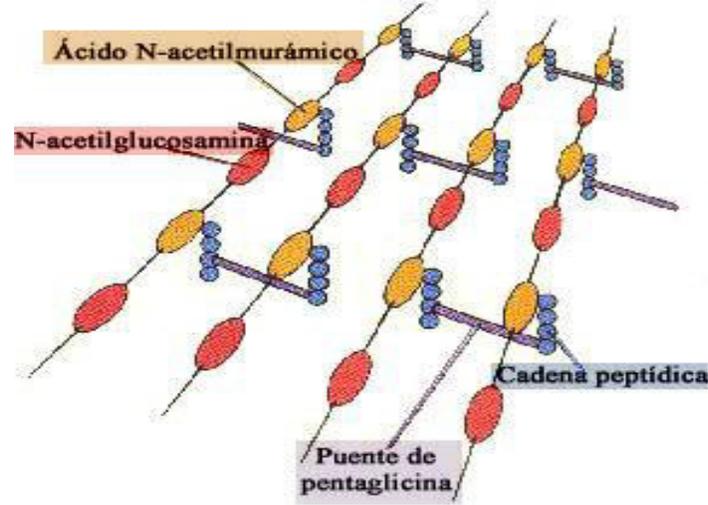
Escherichia coli

PEPTIDOGLICANO o MUREINA

- ❖ Capa rígida de las paredes celulares de bacterias responsable de la resistencia.
- ❖ Polisacárido formado por 2 derivados de azúcares (N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico) y un pequeño grupo de aminoácidos (L-alanina, D-alanina, D-glutámico y lisina o en su lugar ácido diaminopimérico –DAP-).
- ❖ Estos componentes se unen entre sí por enlaces peptídicos para formar una estructura repetitiva que constituye el tetrapéptido del glicano.

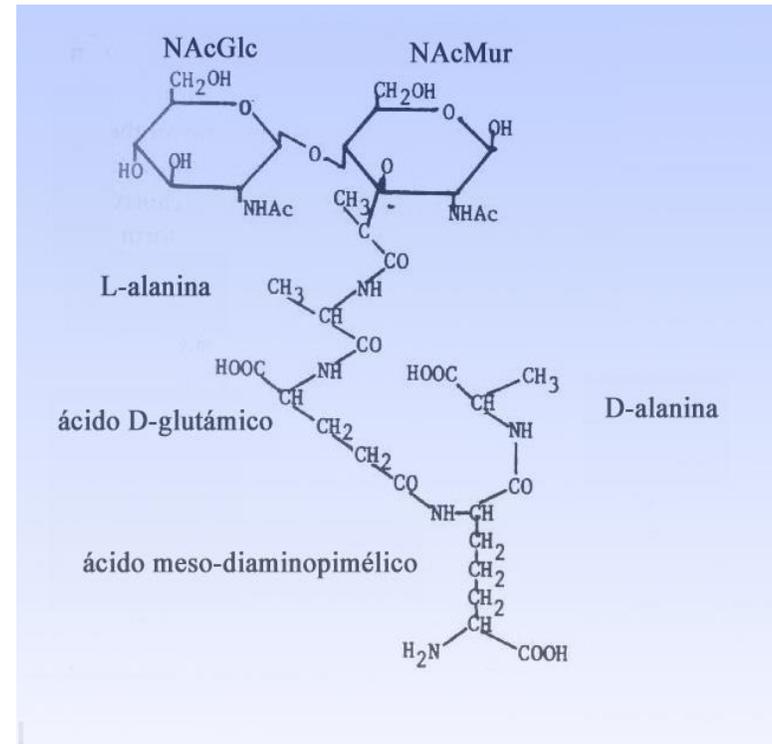
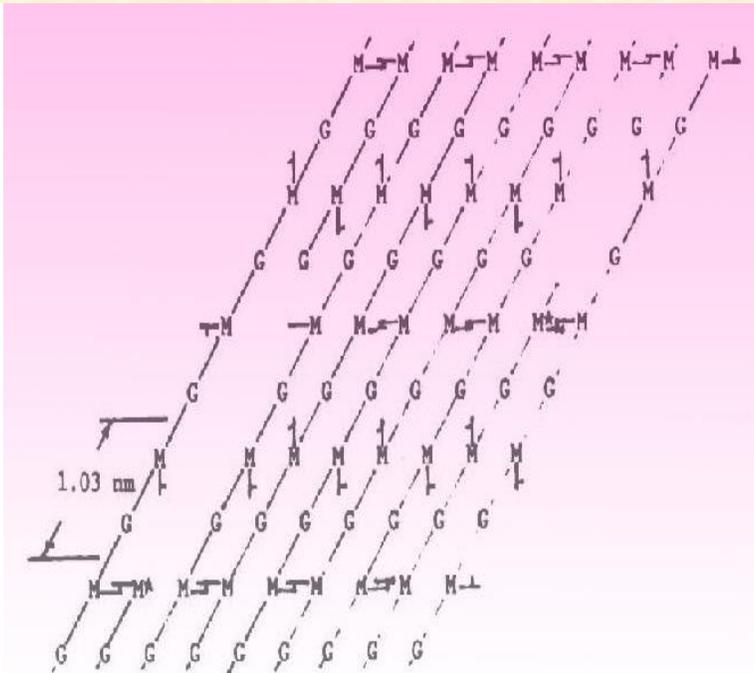


Peptidoglicano o mureína

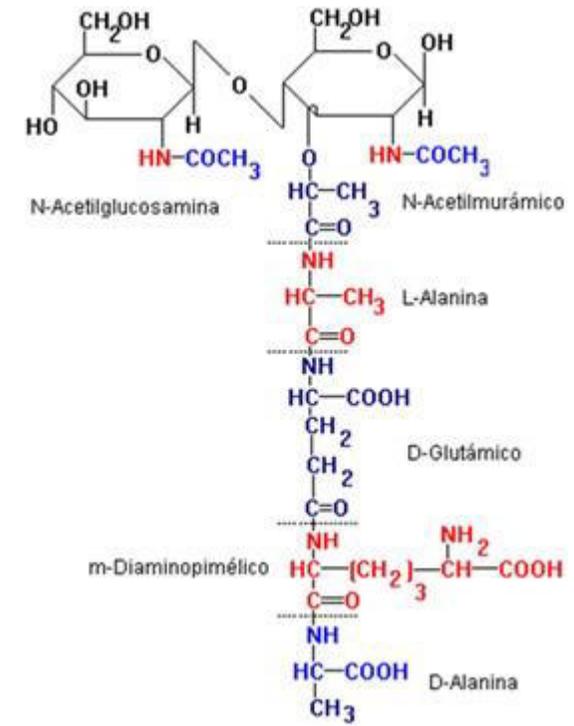
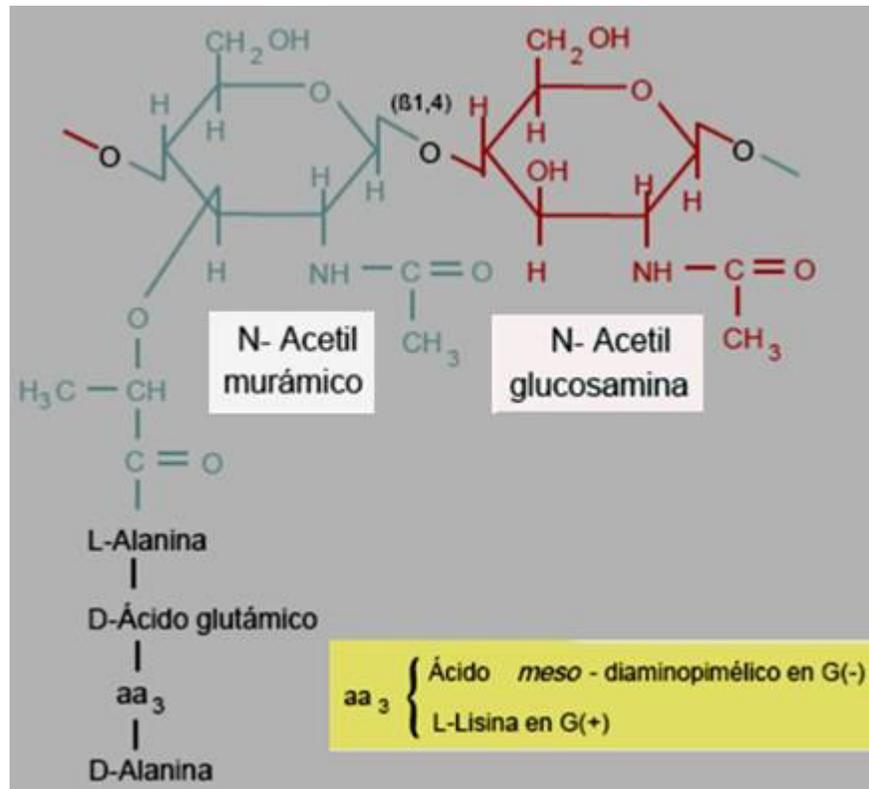


Péptidoglicano de Gram +

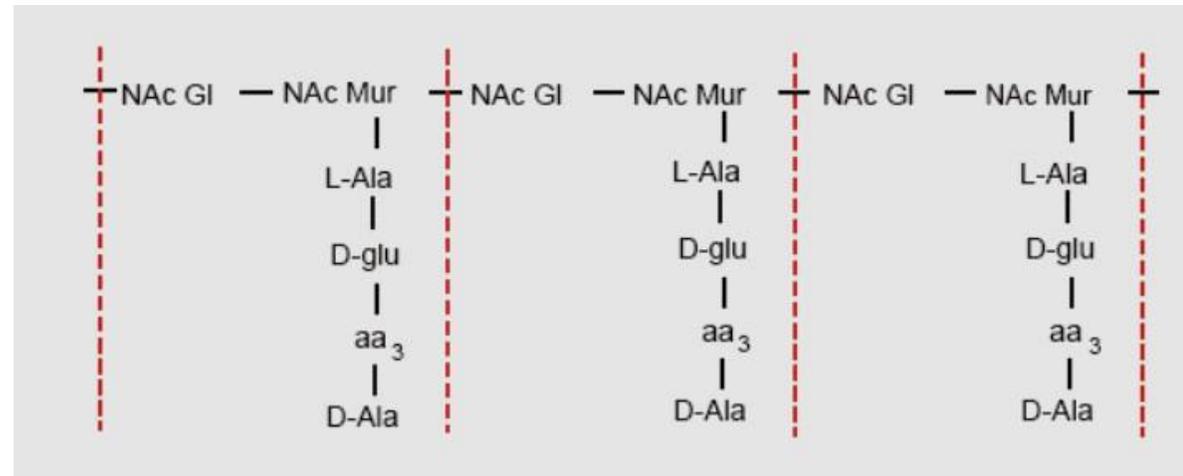
Péptidoglicano de Gram -



Mureopéptido de Gram -

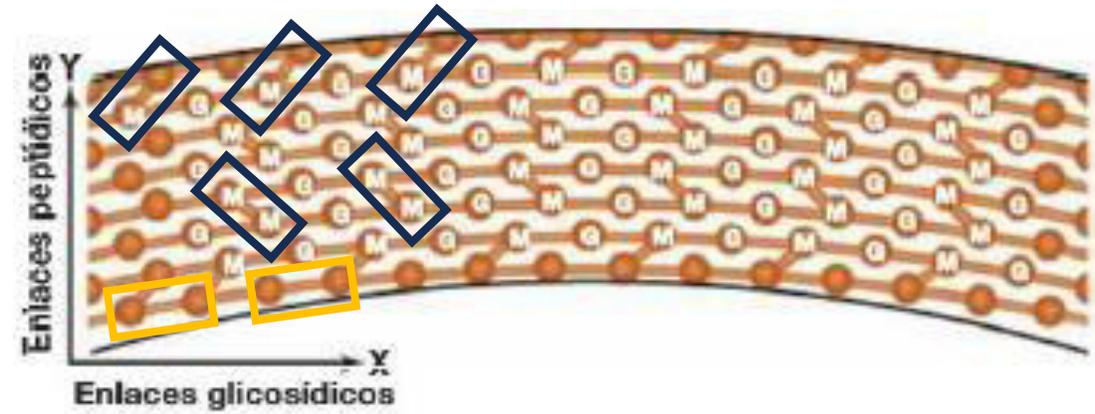
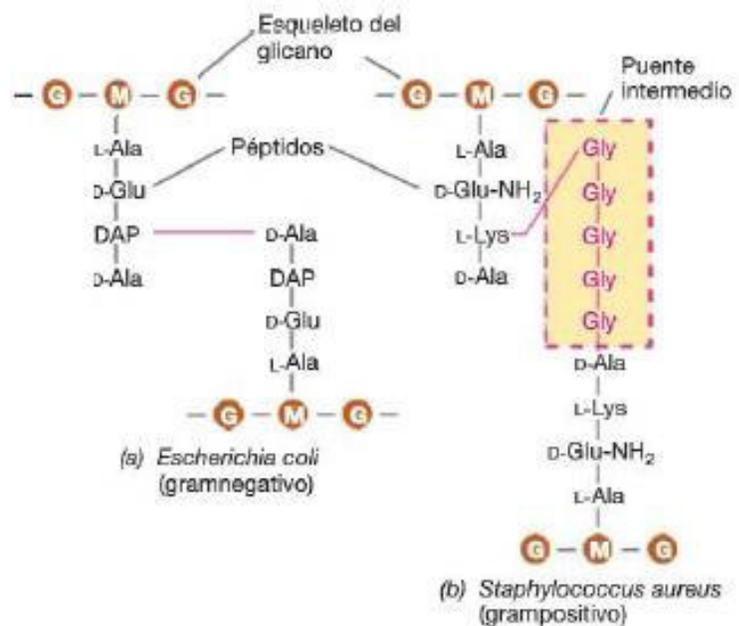


Cadena de peptidoglicano



BIOSÍNTESIS DEL PEPTIDOGLICANO

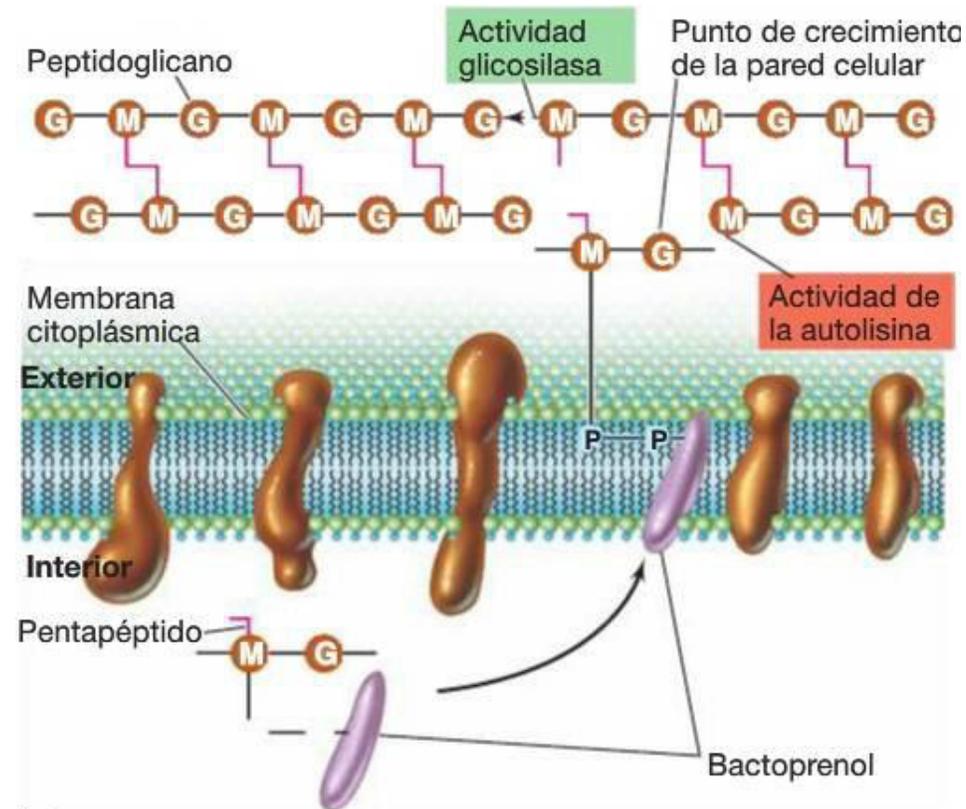
- ❖ Se generan largas cadenas adyacentes de peptidoglicano formando una lámina que rodea la célula.
- ❖ Las distintas cadenas se conectan entre sí por puentes peptídicos que se establecen a través de los aminoácidos del tetrapéptido.
- ❖ Los enlaces glicosídicos que unen los azúcares en las cadenas del glicano son enlaces covalentes que proporcionan rigidez a la estructura solamente en una dirección del espacio, de modo que tan solo tras el entrecruzamiento mediante los puentes peptídicos se logra la rigidez bidimensional característica de la capa de peptidoglicano.



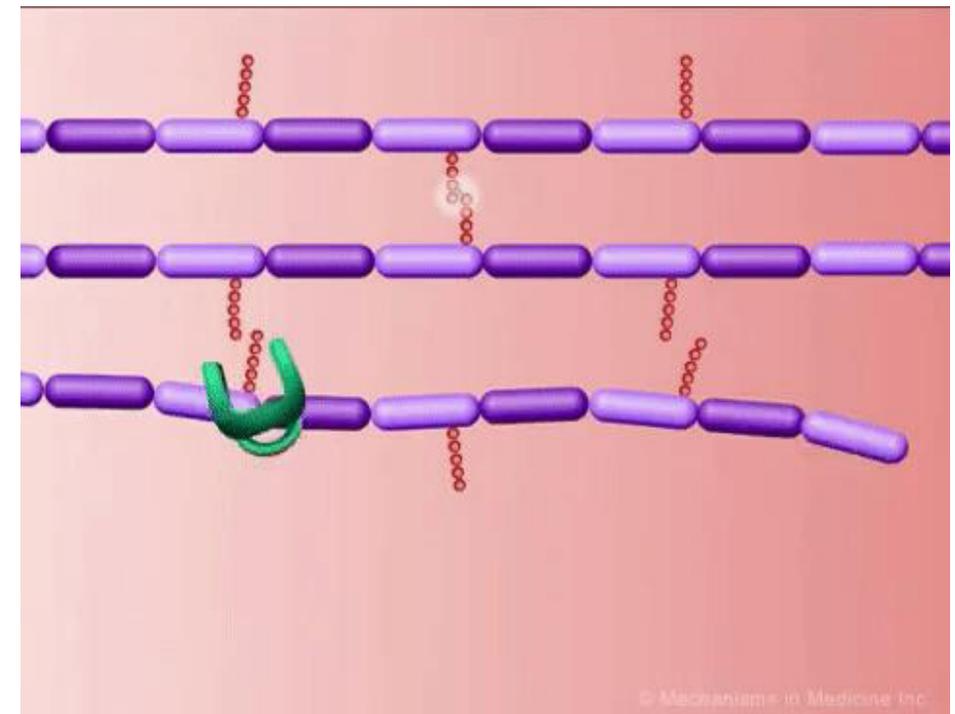
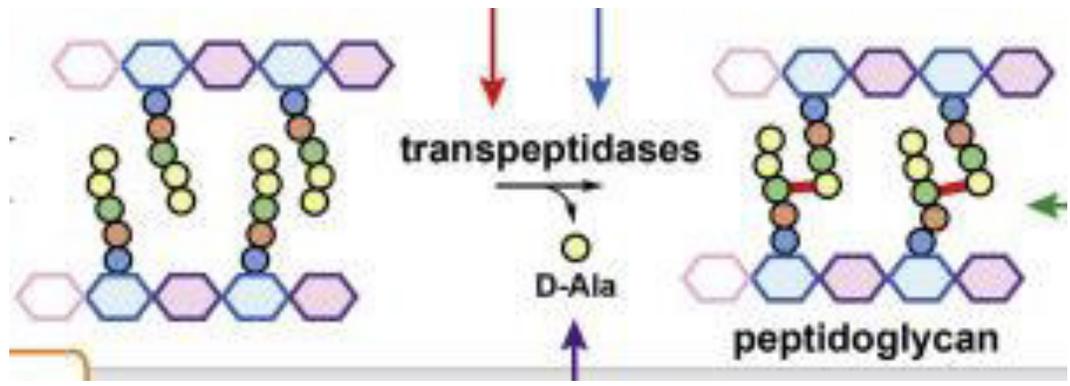
BIOSÍNTESIS DEL PEPTIDOGLICANO



- ❖ La capa de peptidoglicano actúa como una malla anti-estrés, a modo de cubierta de un neumático.
- ❖ Durante el crecimiento celular, la síntesis de nuevo peptidoglicano supone el corte controlado del peptidoglicano preexistente por las autolisinas y la inserción simultánea de precursores.
- ❖ En este proceso interviene, como transportador, una molécula lipídica, el bactoprenol, que facilita el transporte de las nuevas unidades a través de la membrana para incorporarse a la pared celular en crecimiento.
- ❖ El bactoprenol acarrea los precursores de la pared celular, en el periplasma interactúa con la enzima que inserta los precursores de pared celular y cataliza la formación del enlace glucosídico.



- ❖ La transpeptidasa forma el enlace peptídico entre las cadenas de aminoácidos de las unidades de mureína.
- ❖ Durante el crecimiento celular, la nueva pared se sintetiza insertando nuevas unidades de glicano y tetrapéptido en el material preexistente.
- ❖ La transpeptidación fija a los precursores en la malla formada por las cadenas de peptidoglicano.

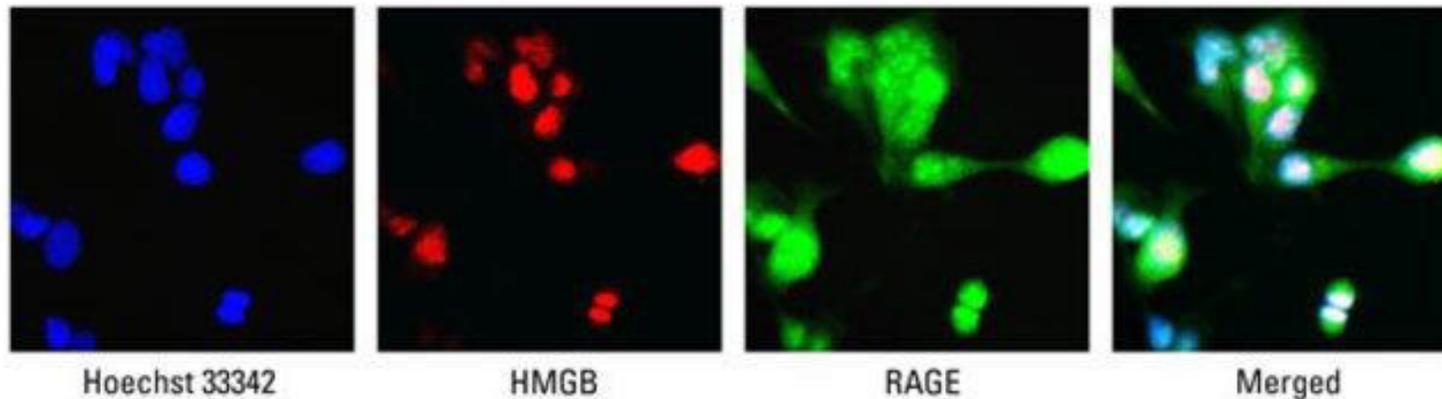


TINCIONES

Incremento del contraste entre la célula y el medio para mejorar la imagen final para observarla por microscopía usando colorantes que tiñen la célula

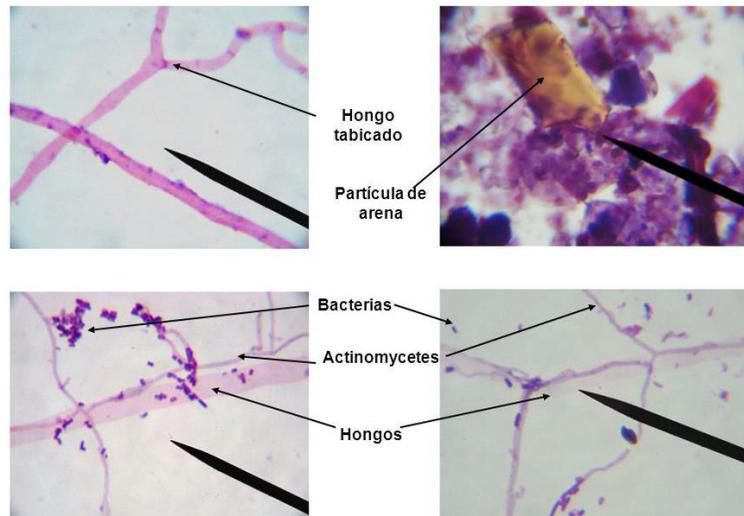
COLORANTES

- ❖ Compuestos orgánicos con afinidad por determinados componentes celulares.
- ❖ Muchos colorantes utilizados con frecuencia en microbiología están cargados positivamente (son básicos o catiónicos).
- ❖ Se combinan fuertemente con constituyentes celulares cargados negativamente, como las estructuras de la superficie de la célula, ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos.
- ❖ Colorantes básicos: azul de metileno, cristal violeta y safranina.



COLORACIÓN SIMPLE O DIRECTA

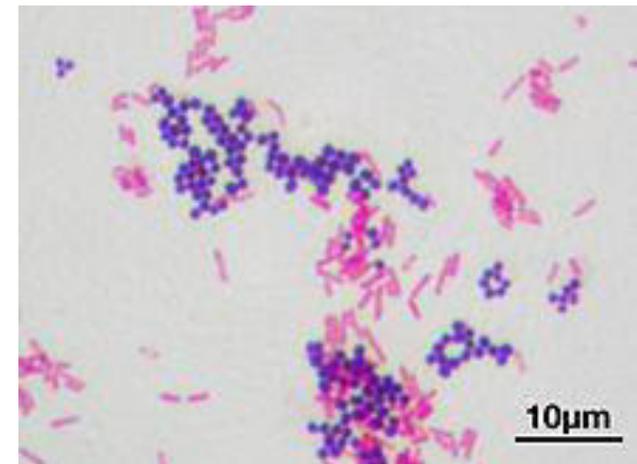
- ✓ Se utiliza 1 solo colorante (básico).
- ✓ Todas las células absorben el colorante.
- ✓ Si el colorante proporciona una coloración al fondo, sin alterar el aspecto ni teñir las células se denomina tinción NEGATIVA.
- ✓ Permite observar morfología celular, tamaño y agrupación de los microorganismos.



COLORACIÓN DIFERENCIAL



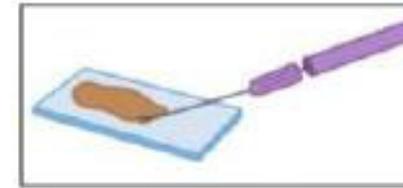
- ✓ Ayuda en la clasificación de las bacterias ya que emplean secuencialmente 2 colorantes que permiten distinguir tipos de microorganismos en función de diferencias en su estructura y composición química.
- ✓ La tinción de GRAM y la ácido-alcohol-resistente, basadas en las propiedades de la pared celular bacteriana, son las más utilizadas.



TINCIONES SIMPLES

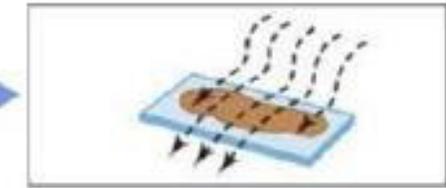


- Se realizan sobre preparaciones previamente secadas.
- Sobre un portaobjetos con una suspensión de microorganismos previamente secada y fijada a la llama.
- Se vierten colorantes y se mantiene durante 1-2 minutos.
- Se lava varias veces con agua y se seca.

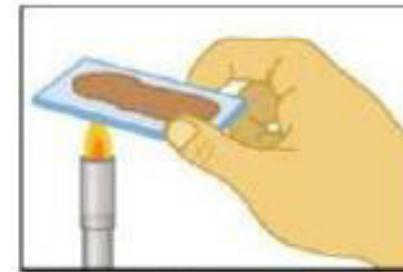


Extensión de una fina capa de muestra sobre el portaobjetos

I. Preparación de un frotis

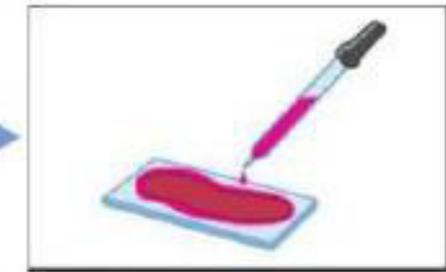


Secar al aire



Fijación por flameado del portaobjetos

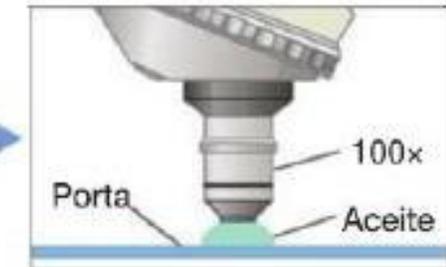
II. Fijación por calor y tinción



Adición de colorante; lavar y secar



III. Microscopía

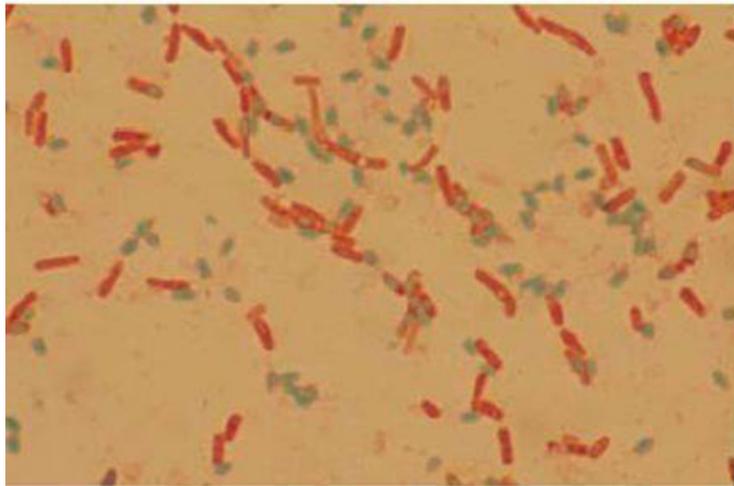


Colocar una gota de aceite de inmersión en el portaobjetos y examinar con objetivo de 100x

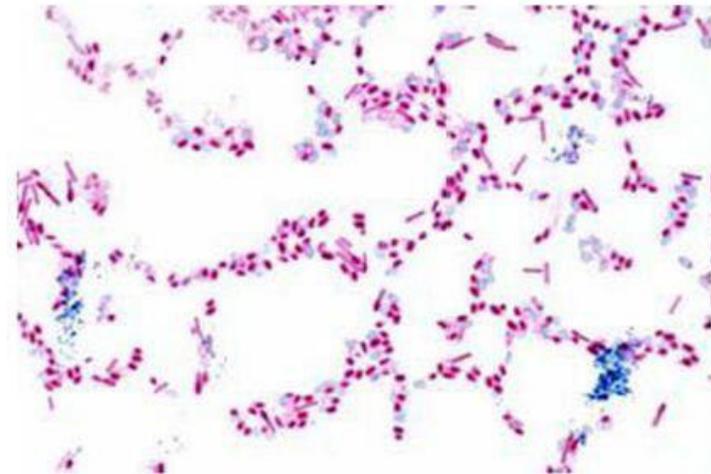
COLORACIONES ESPECIALIZADAS

- ✓ Para identificar y estudiar determinadas estructuras en los microorganismos.
- ✓ Se colorea únicamente una parte de la célula.
- ✓ Se utiliza para poner en evidencia la presencia de cápsulas, endosporas, flagelos o inclusiones (almidón, polifosfato, etc.).

Tinción de esporas



Bacillus cereus



Clostridium botulinum

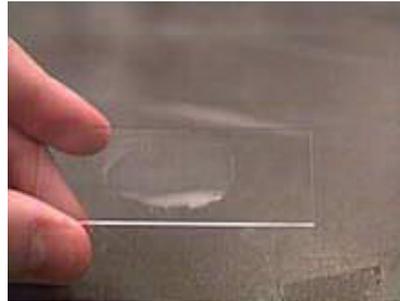
TINCIÓN SIMPLE DE AZUL DE METILENO

Cloruro de metiltionina

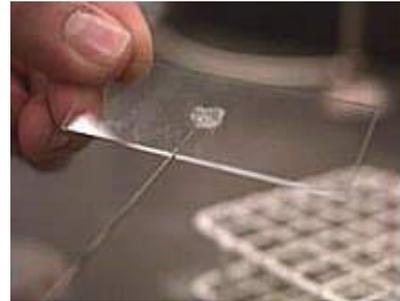


Tiñe estructuras del citoplasma

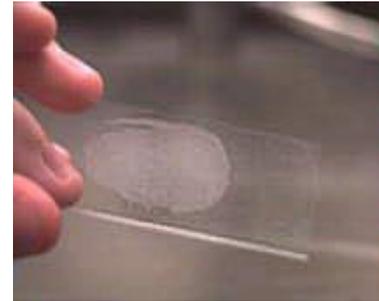
Frotis y fijación



1.- Poner una gota de agua en un porta



2.- Tomar la muestra con el asa de siembra



3.- Extender sobre el agua, secar y fijar a la llama del mechero

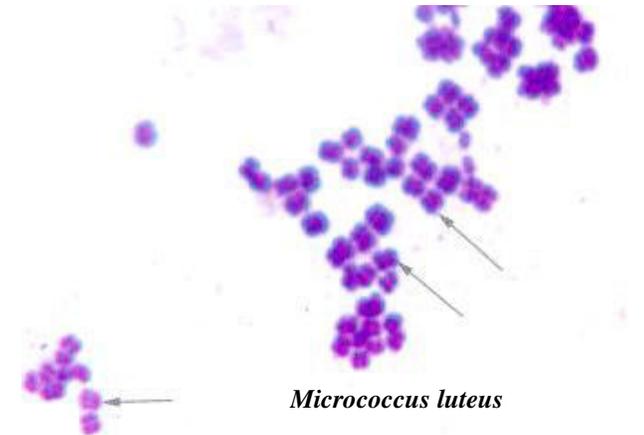
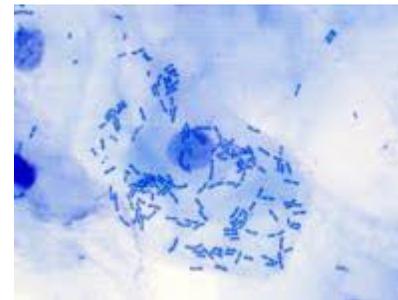
Tinción



1.- Cubrir la preparación con Azul de Metileno 3-5'



2.- Lavar con agua, dejar secar y observar al microscopio



Micrococcus luteus



TINCIÓN DE ÁCIDO-ALCOHOL-RESISTENTE



De Ziehl-Neelsen

Tinción diferencial rápida y económica, usada para la identificación de bacterias ácido-alcohol resistentes (BAAR) , como *M. tuberculosis* o el *Phylum Apicomplexa* (coccidios intestinales) entre otros.

Descrita por primera vez por los médicos alemanes: Franz Ziehl y Friedrich Neelsen.

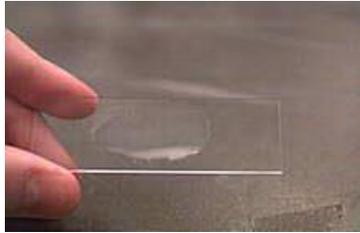
- ❖ Se denominan ácido-alcohol resistentes porque las paredes celulares de ciertas bacterias contienen ácidos grasos (ácidos micólicos) de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos.
- ❖ Las micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis* y *M. marinum* son ácido-alcohol resistentes.
- ❖ La coloración requiere calentamiento para que el colorante atraviese la pared bacteriana que contiene ceras.
- ❖ Al suspender el calentamiento y enfriar con agua, provoca una nueva solidificación de los ácidos grasos de modo que el colorante ya no puede salir de las bacterias.
- ❖ El calentamiento también aumenta la energía cinética de las moléculas del colorante lo cual también facilita su entrada a las bacterias.

TINCIÓN DE ÁCIDO-ALCOHOL-RESISTENTE

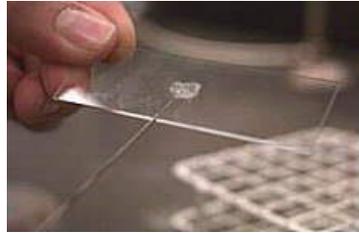


De Ziehl-Neelsen

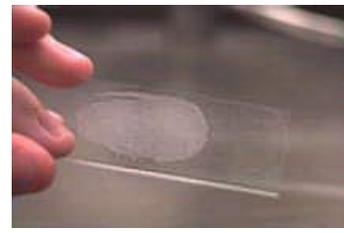
Frotis y fijación



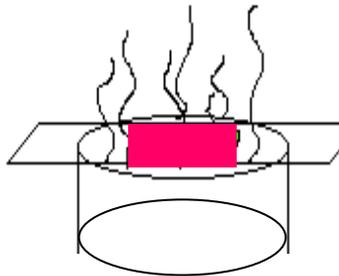
1.-Poner una gota de agua en un porta



2.- Tomar la muestra de un cultivo de *Mycobacterium*



3.-Extender sobre el agua y fijar a la llama del mechero



2.-Calentar con un hisopo de algodón empapado en alcohol y prendido con la llama del mechero hasta la emisión de vapores. Mantener durante 5 minutos.



3.-Lavar con agua y decolorar con alcohol ácido



4.-Teñir con Azul de Metileno 1'

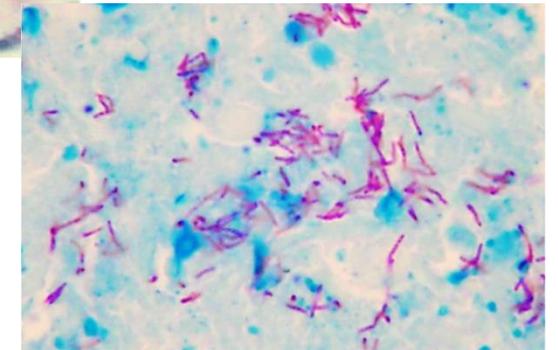
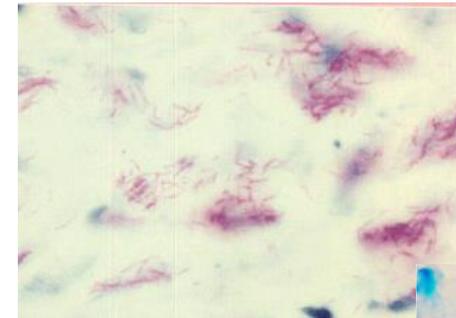


5.-Lavar con agua, dejar secar y observar al microscopio

Tinción



1.-Cubrir la preparación con Fuchina fenicada



Las bacterias que RESISTEN la decoloración son de color ROJO.

Las que NO, se ven de color AZUL ya que se usa azul de metileno como tinción de contraste.

Tinción de corpúsculos metacromáticos:

Lactobacillus forma gránulos con características tintoriales diferentes a las del resto del citoplasma que se denominan corpúsculos metacromáticos.



1.- Hacer un frotis con Yogurt

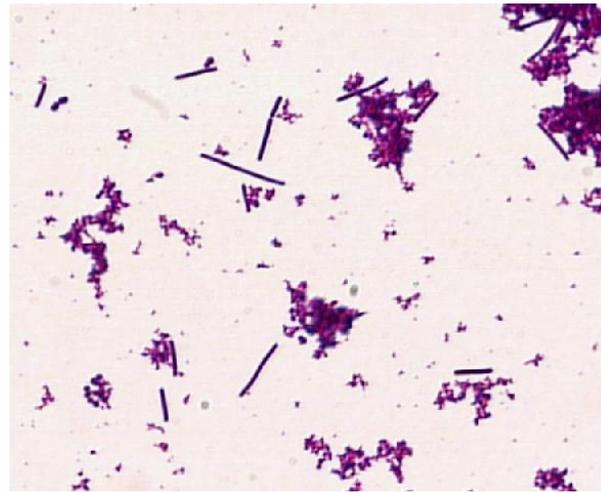
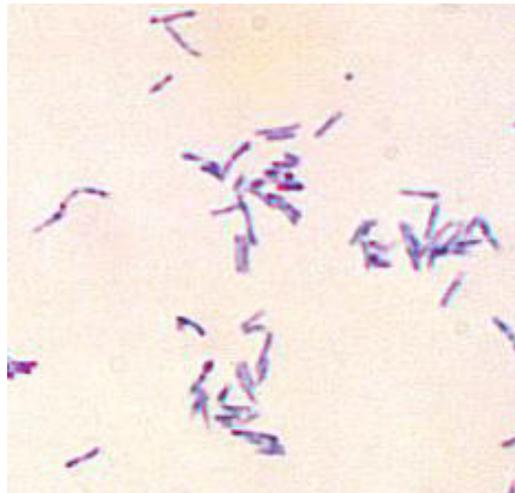


2.- Cubrir la preparación con Azul de Metileno 5'



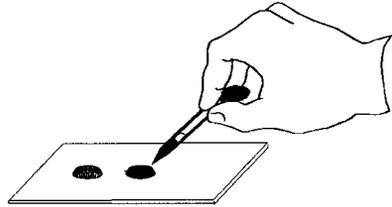
3.- Lavar con agua, dejar secar y observar al microscopio

Corpúsculos metacromáticos

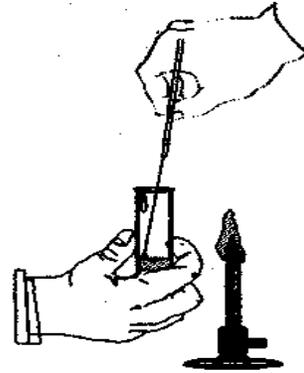


TINCIÓN NEGATIVA

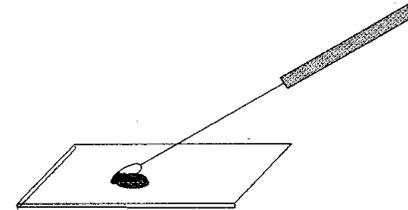
Permite contrastar las muestras mediante una sustancia opaca a los fotones (MO) o a los \bar{e} (ME).
Por ejemplo para ver esporas



1.- Colocar una gota de Nigrosina o tinta china en un porta

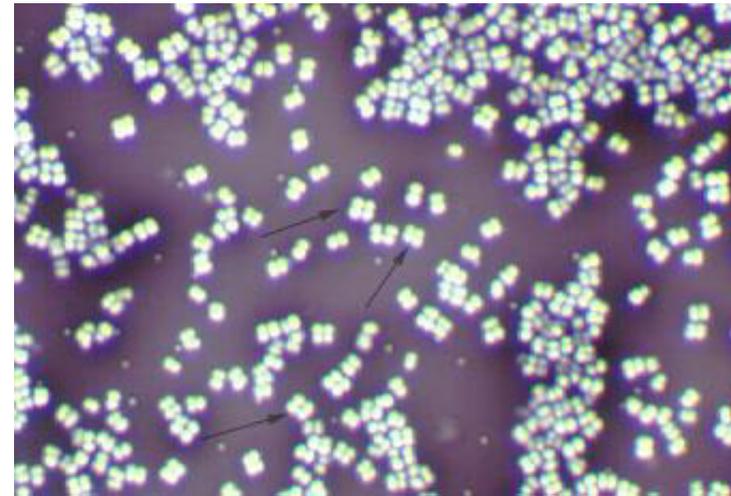
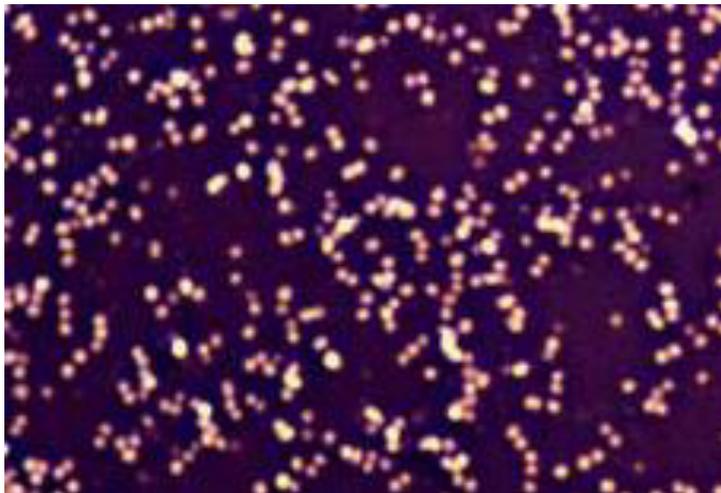


2.- Tomar muestra del microorganismo con el asa, flamear el tubo y tapar



3.- Mezclar con la Nigrosina y extender por todo el porta. Secar al aire y observar

Refringentes sobre un campo de fondo oscuro.



TINCIONES DIFERENCIALES

Tiñen de diferente color a células que son de diferentes tipos.

LA TINCIÓN DE GRAM

Técnica desarrollada por el bacteriólogo Danés Christian Gram en 1884

Referirse a la morfología

Primera aproximación a la
diferenciación bacteriana

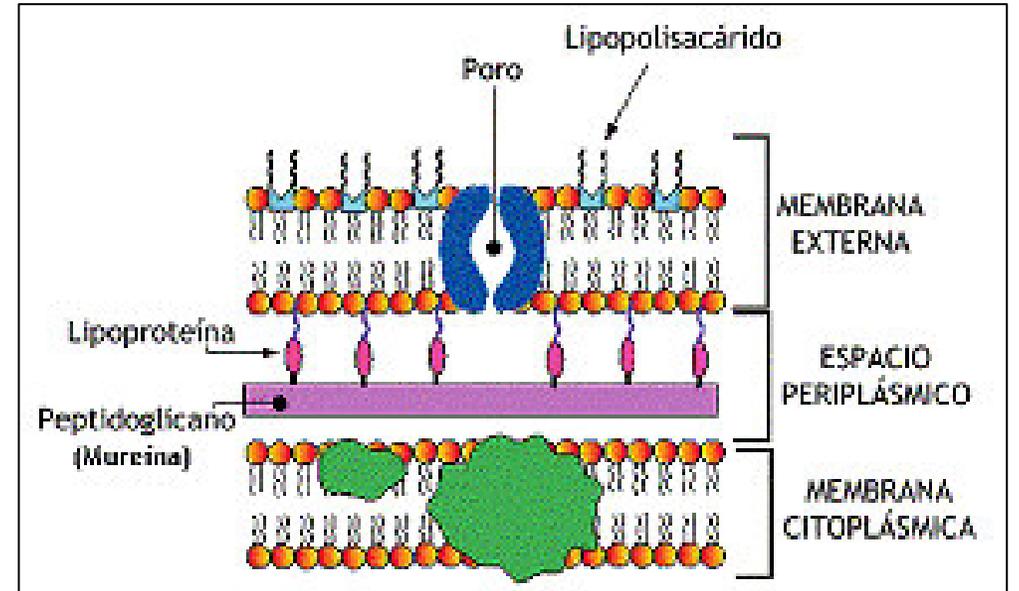
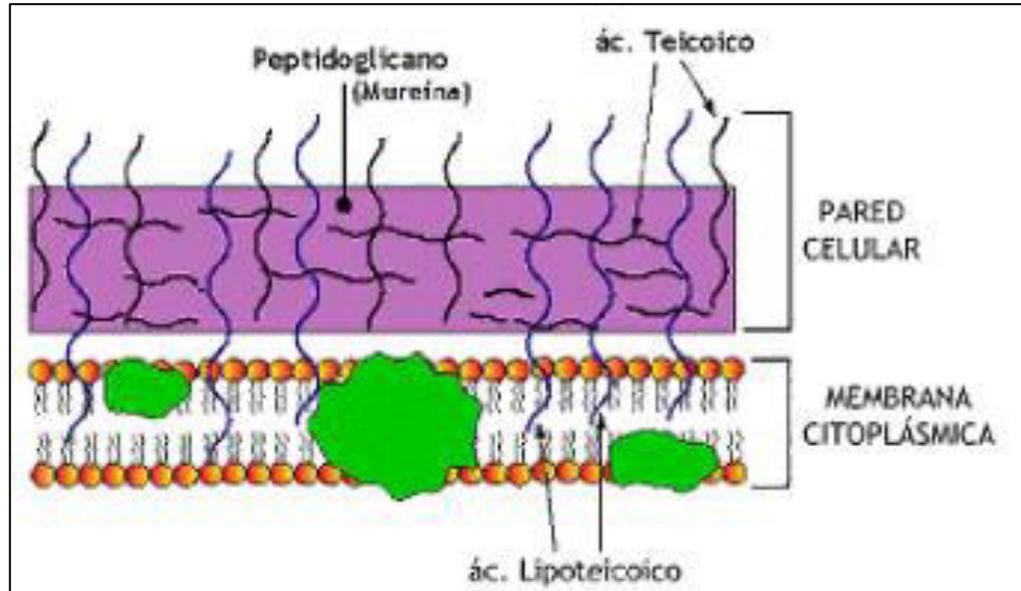
Gram +



Gram -

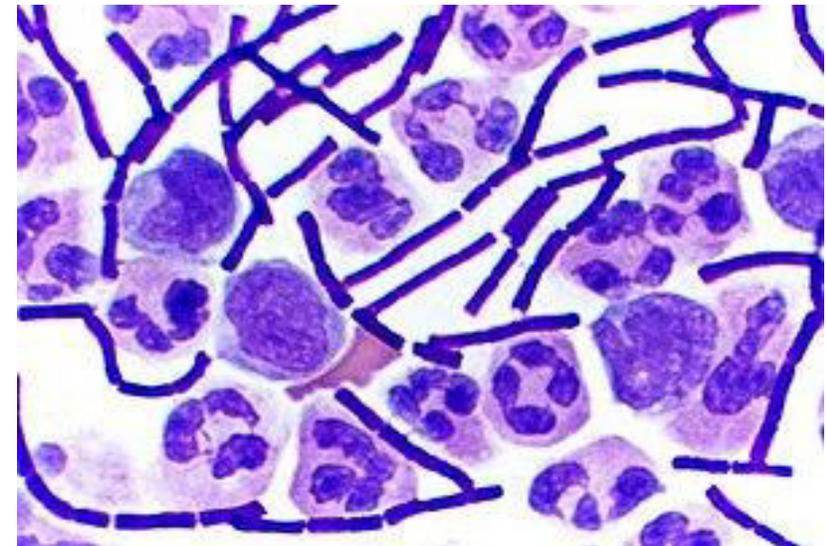
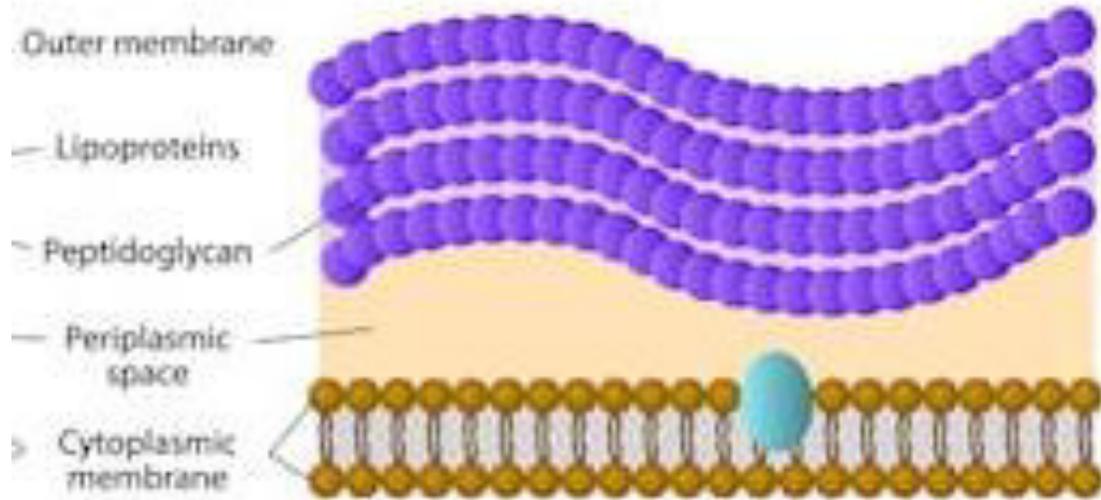


Es uno de los métodos de coloración diferencial más importante para las bacterias, ya que las divide en 2 grandes grupos: Gram + y Gram - según las diferencias estructurales en la pared o envoltura, que permiten retener, o no, uno de los colorantes.

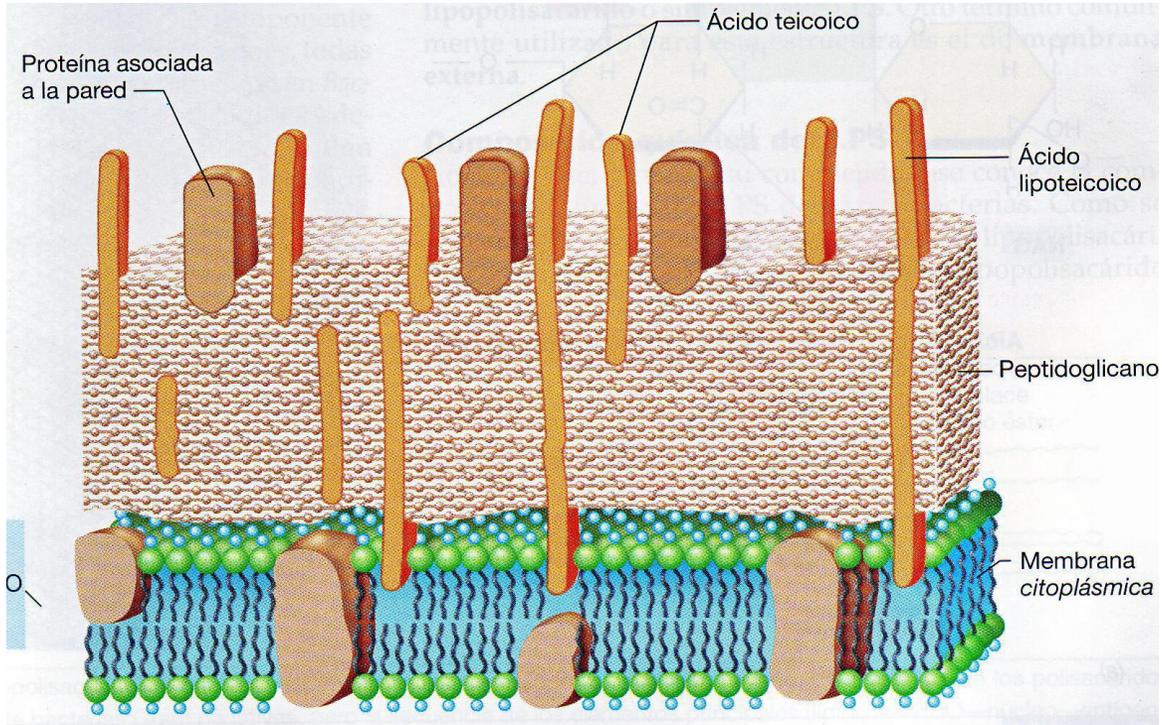


GRAM +

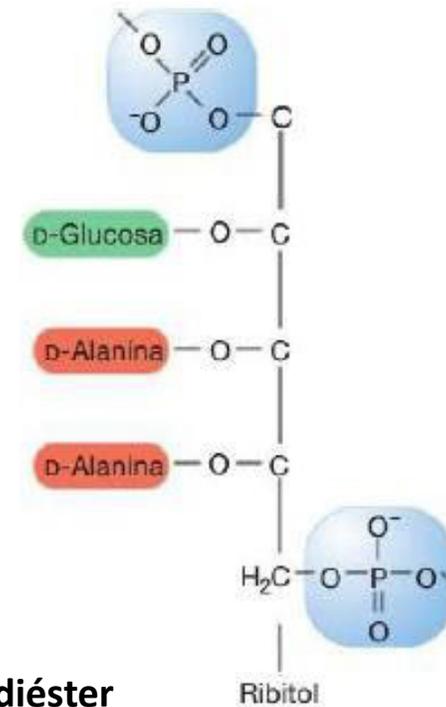
- ❖ Organismos que resisten la decoloración y retienen el complejo cristal violeta-iodo y aparecerán de color violeta oscuro al microscopio.
- ❖ Estas bacterias tienen una pared GRUESA formada por varias capas interconectadas de peptidoglicano (mureína) así como algo de ácido teicoico.
- ❖ En general, el 80-90% de la envoltura o pared de las Gram + es peptidoglicano.
- ❖ Al deshidratarse por acción del alcohol se cierran los poros disminuyendo así el espacio entre las moléculas y provocando que el complejo cristal violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular.
- ❖ Así, las bacterias quedan teñidas de color violeta.



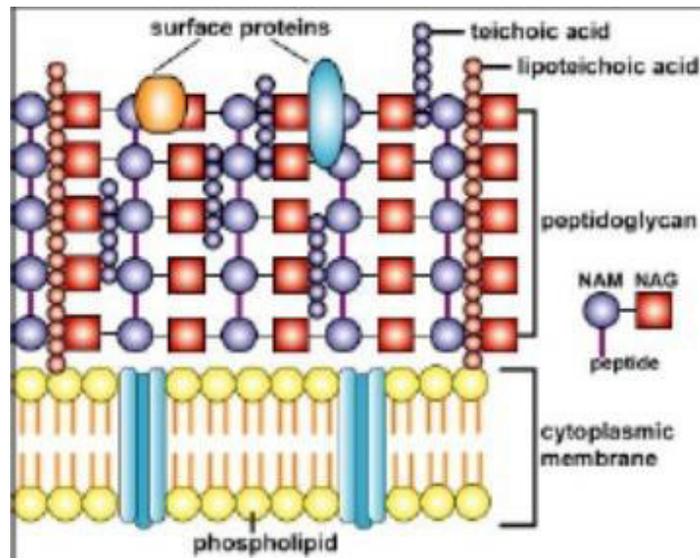
PARED CELULAR GRAM +



polímeros de un polialcohol:
glicerol o ribitol

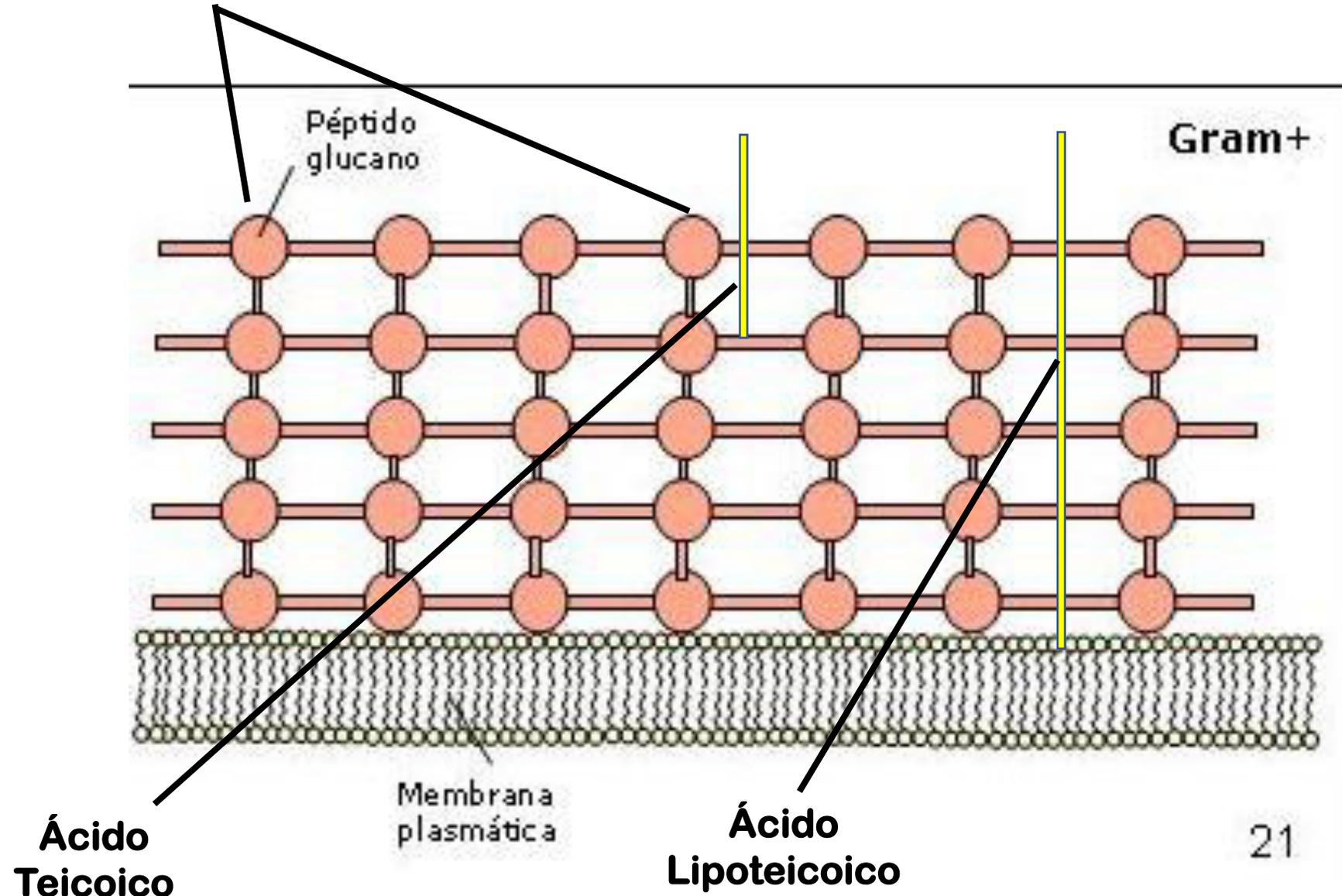


unidos mediante enlaces fosfodiéster



Estructura del ácido ribitolteicoico de *Bacillus subtilis*.
El ácido teicoico es un polímero de unidades repetitivas de ribitol

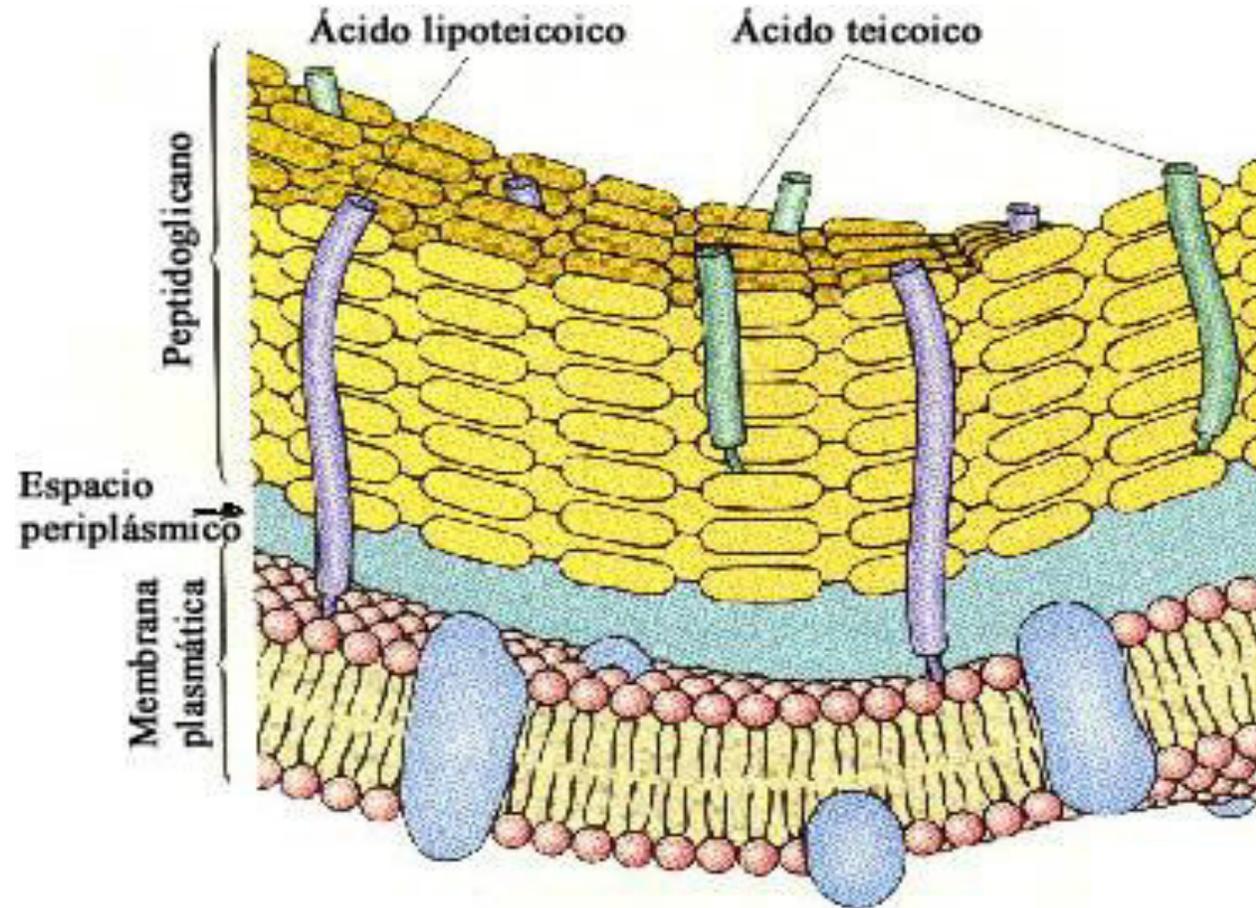
MUREÍNA o PEPTIDOGLUCANO Anillos de polisacáridos unidos por péptidos



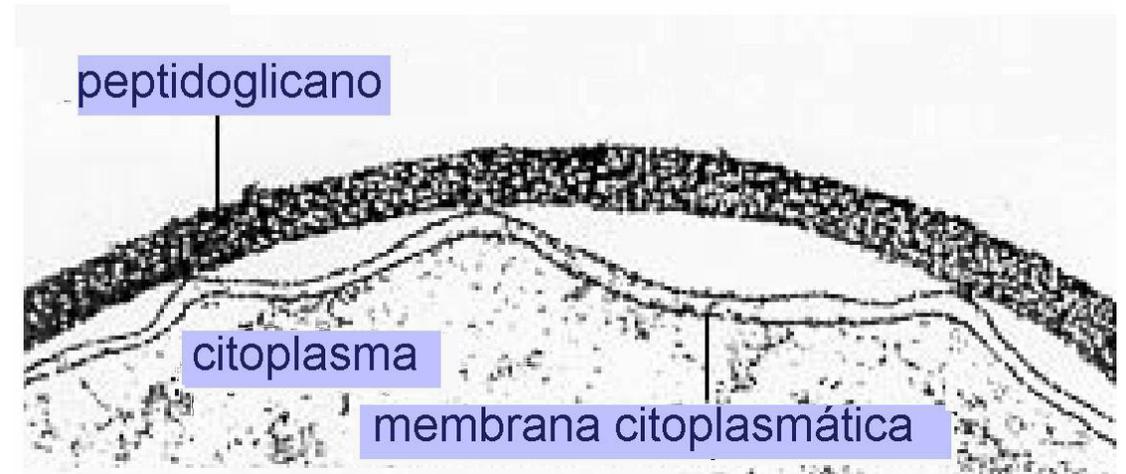
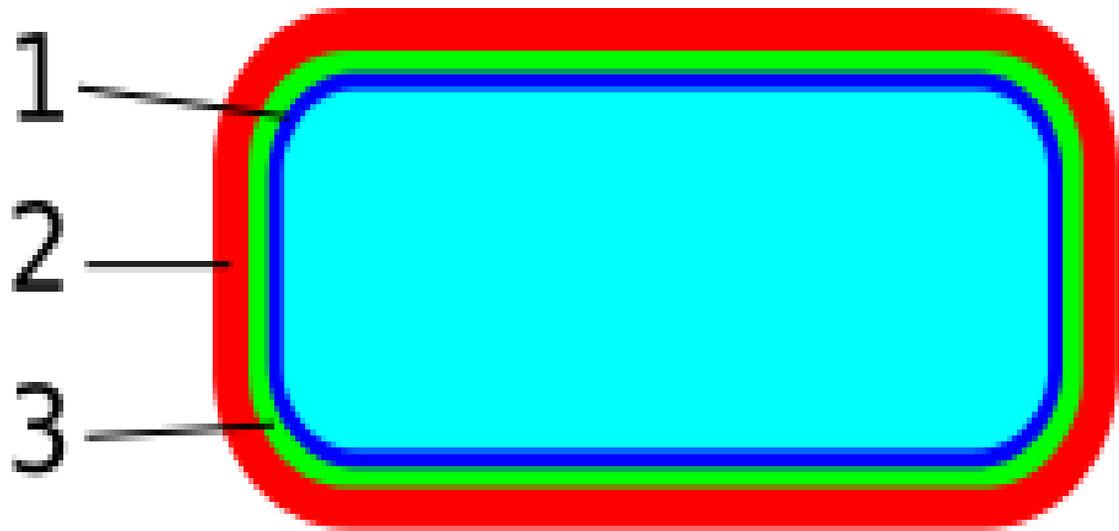
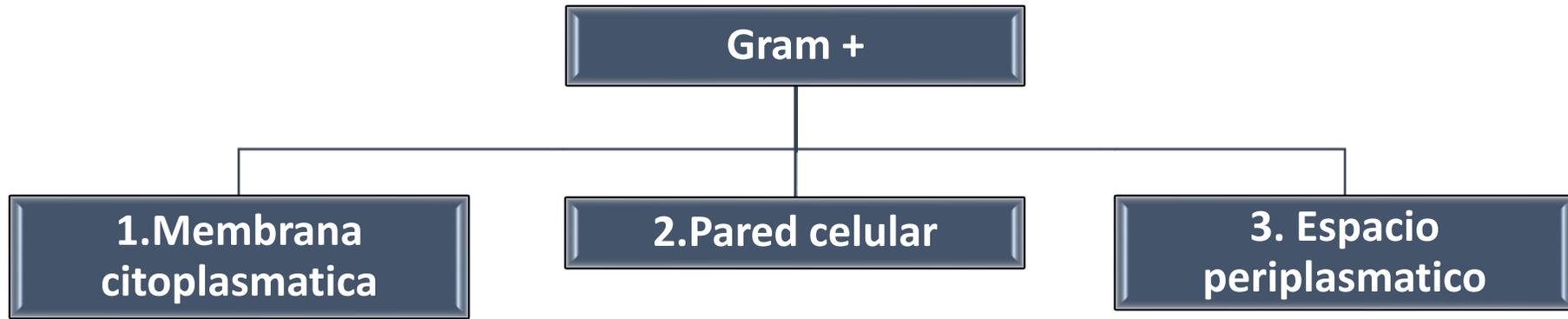
ÁCIDOS TEICOICOS



- ❖ Polímeros de un polialcohol (glicerol o ribitol) unidos mediante enlaces fosfodiéster.
- ❖ Se encuentran en la pared celular de las bacterias Gram +, extendiéndose sobre la superficie de la capa de peptidoglicano.



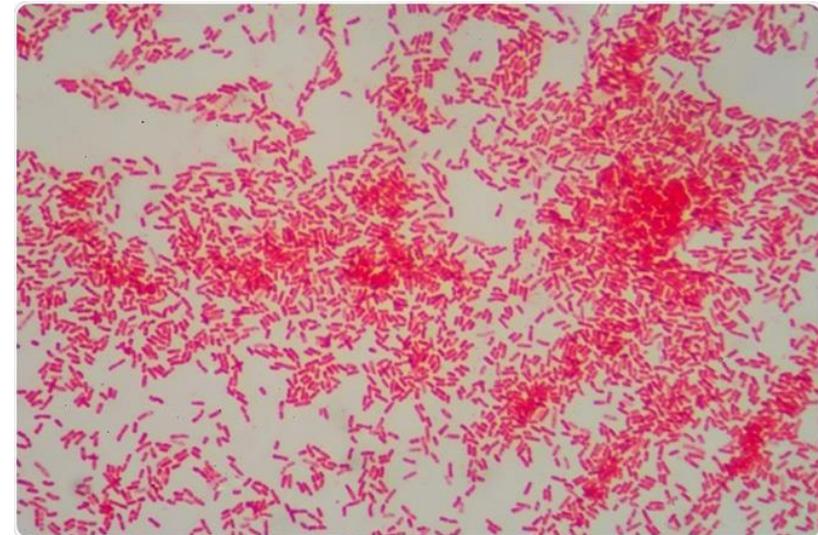
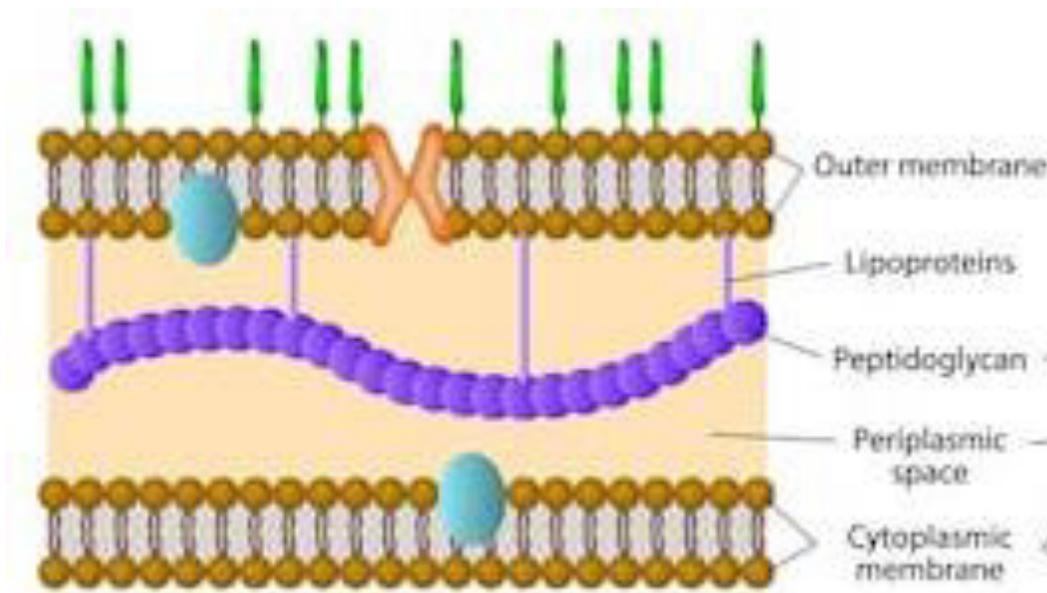
Staphylococcus, Streptococcus, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium y Listeria.



GRAM -



- ❖ Pierden el color inicial del cristal violeta tras la decoloración y toman el color rosa del 2do colorante.
- ❖ La pared de las Gram - contienen una capa mucho más delgada de peptidoglicano (sólo el 10-20%), y está rodeada por una MEMBRANA EXTERIOR de lipopolisacáridos y proteínas, que no constituyen una barrera para el pasaje de los solventes orgánicos.
- ❖ El alcohol desorganiza y disuelve la capa lipídica más externa penetrando fácilmente, y disuelve el complejo violeta-iodo.
- ❖ La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el complejo cristal violeta-iodo y la célula se decolora.

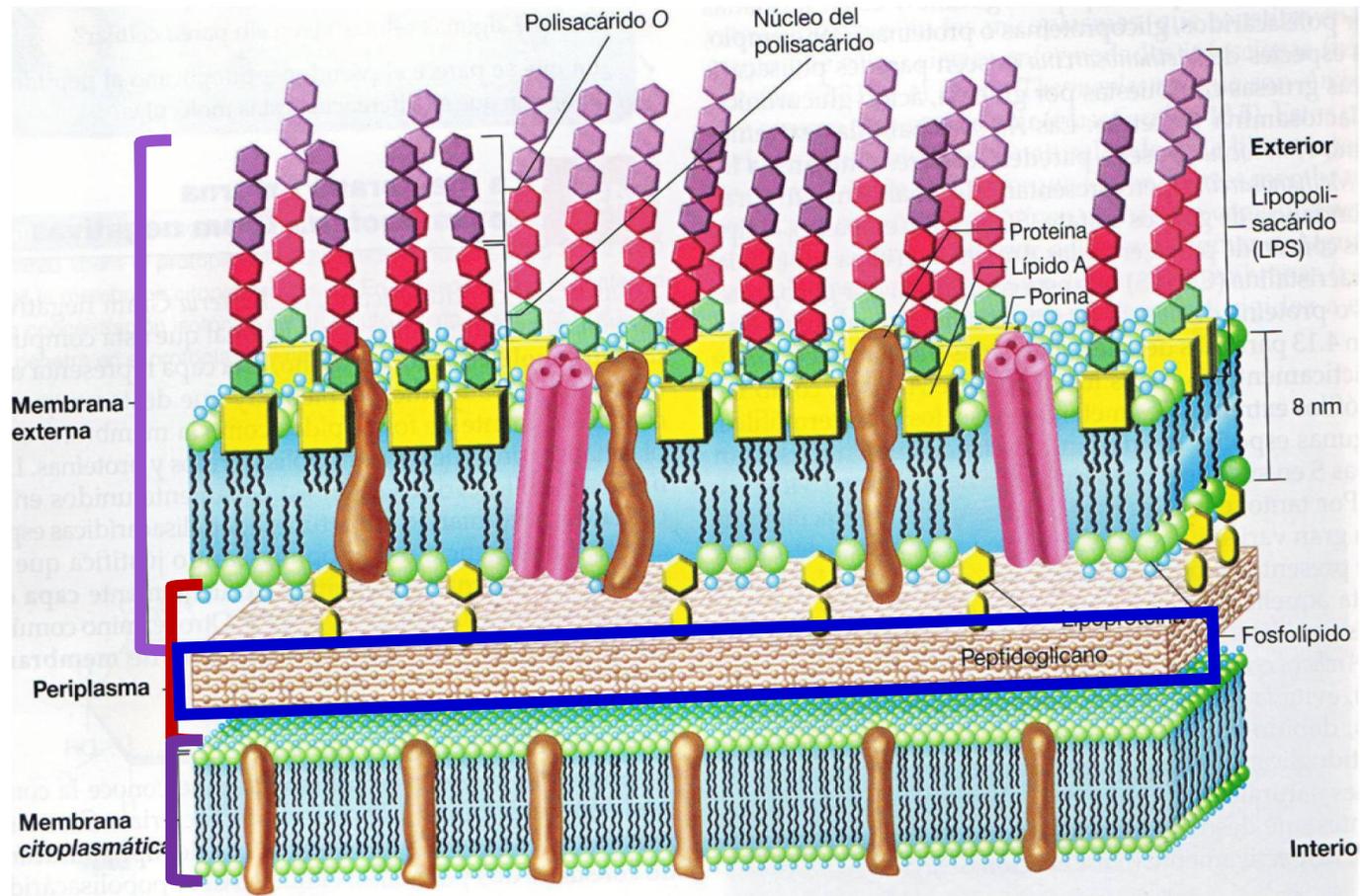


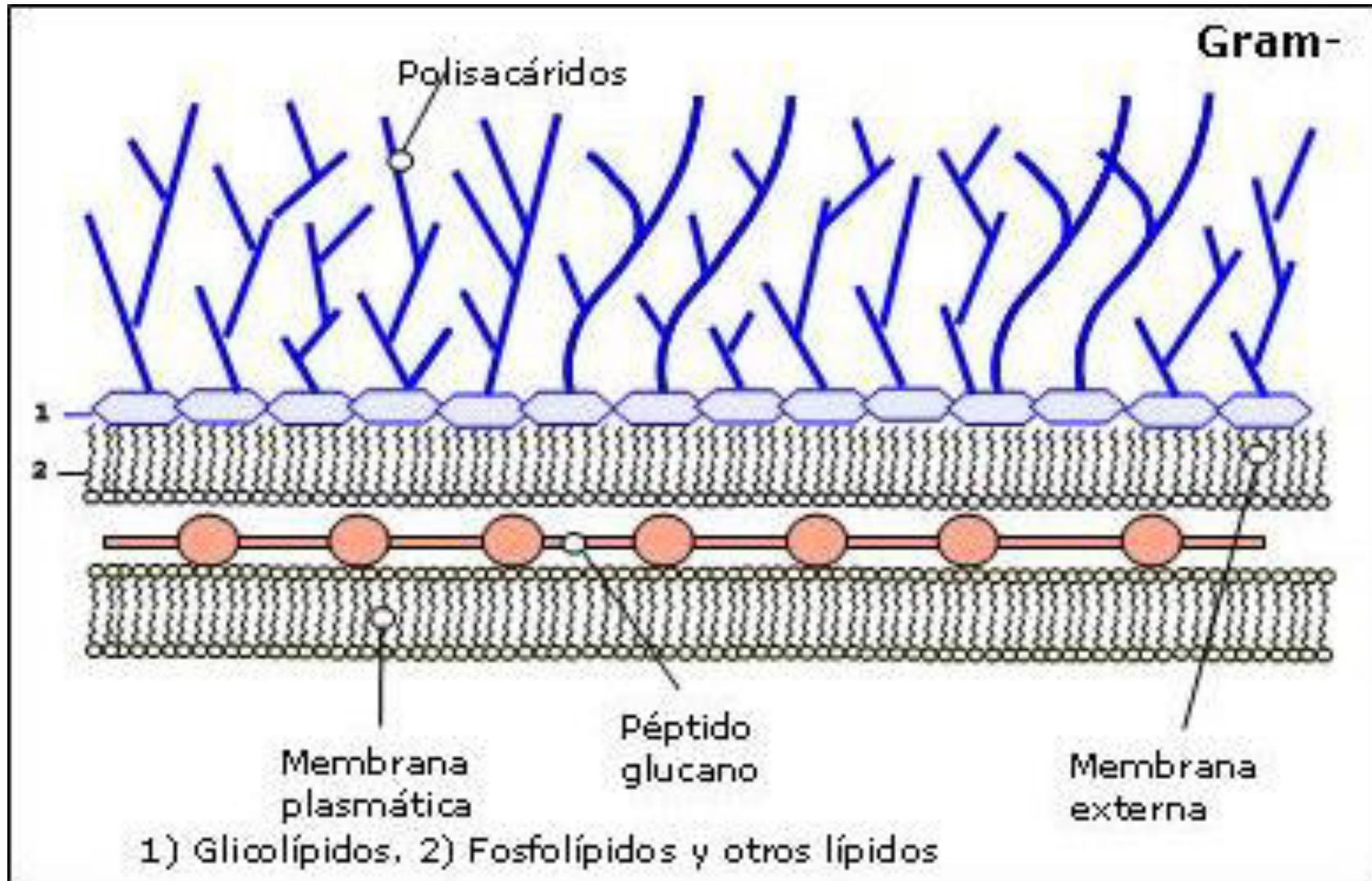
PARED CELULAR GRAM -



MÁS COMPLEJA:

- ✓ Membrana externa con fosfolípidos–proteínas (porinas) y LPS.
- ✓ Espacio periplásmico entre la sup interior de la membrana externa y la MP, PERIPLASMA: mureína y abundantes enzimas.
- ✓ Fina capa de peptidoglicano.
- ✓ Membrana plasmática.







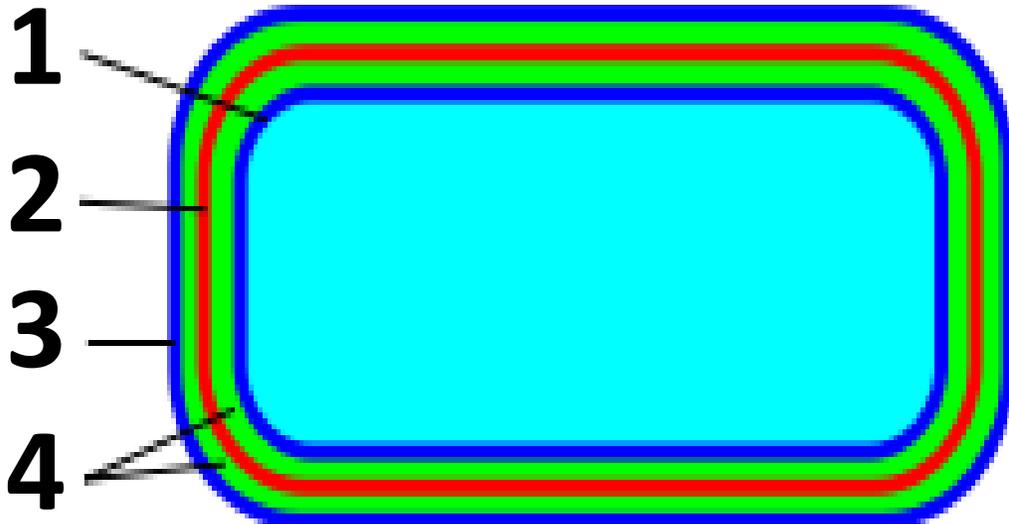
Gram -

1. Membrana plasmática

2. Pared Celular

3. Membrana Externa

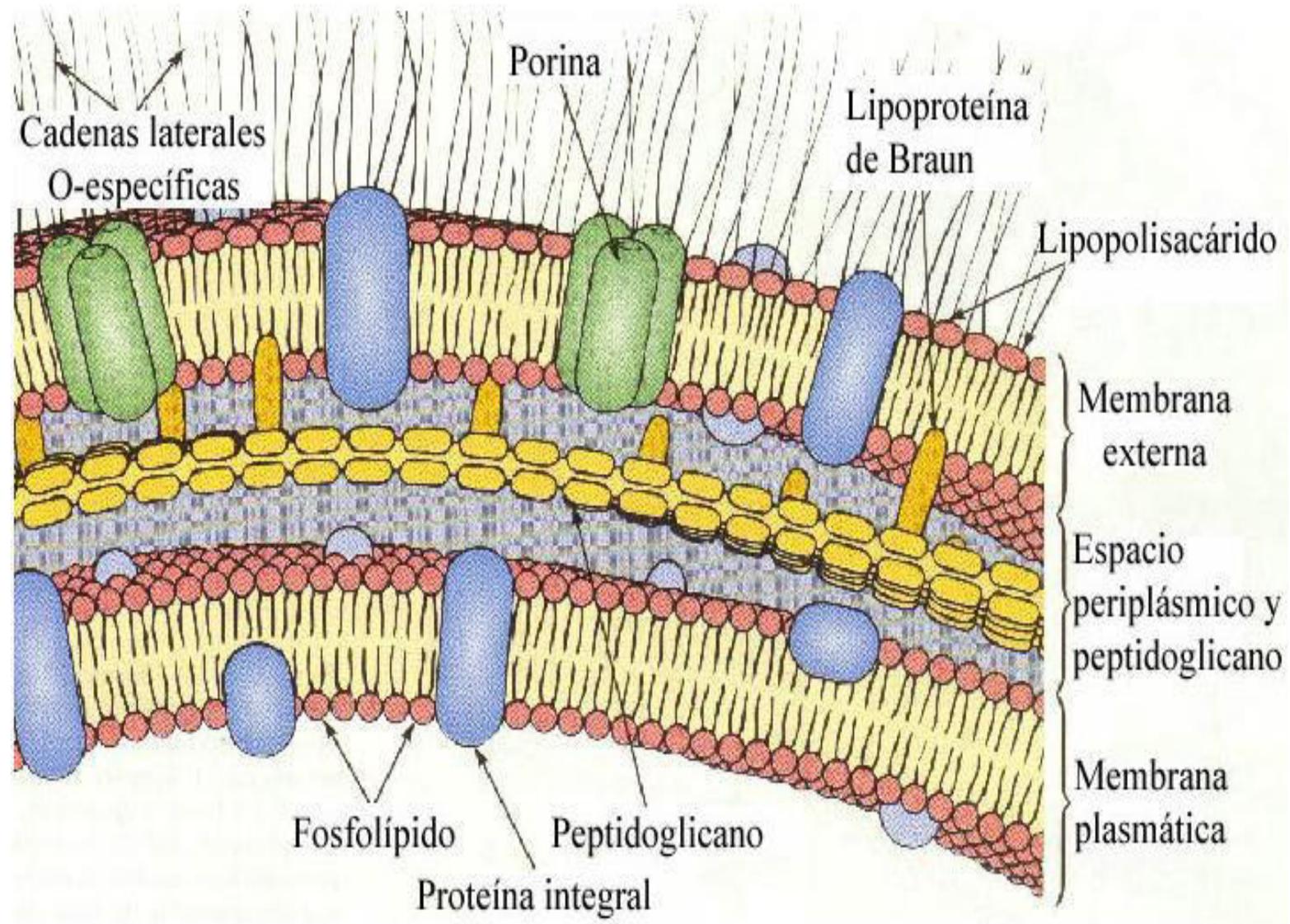
4. Espacio periplasmático



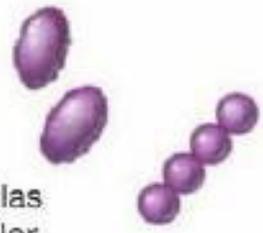
membrana externa

peptidoglicano





Paso 1



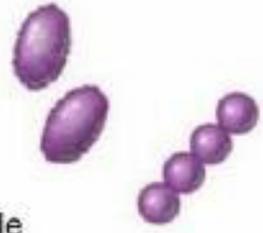
Tinción del frotis, fijado a la llama, con cristal violeta durante 1 minuto

Resultado:

Todas las células se tiñen de color violeta

lavar con agua destilada

Paso 2



Adición de la solución yodo-yodurada de Lugol durante 1 minuto

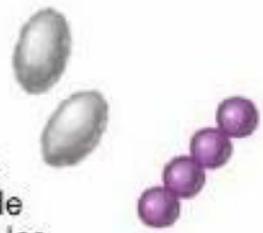
mordiente

Resultado:

Todas las células permanecen de color violeta

La diferencia en la tinción de Gram se debe a diferencias en la estructura de la pared celular de las células Gram + y Gram -

Paso 3



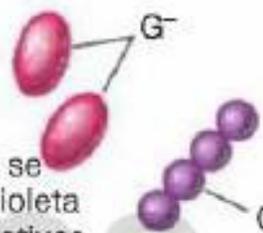
Decoloración breve con alcohol (alrededor de 20 segundos)

Resultado:

Las células grampositivas permanecen de color violeta y las gramnegativas se decoloran

lavar con agua destilada

Paso 4



Tinción de contraste con safranina durante 1-2 minutos

Resultado:

Las células grampositivas se ven de color violeta y las gramnegativas de color rosa

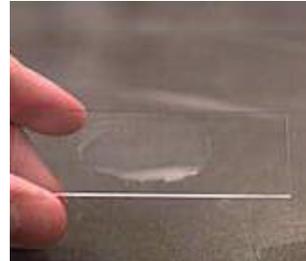
se lava con agua corriente

secar suavemente y sin frotar con papel de filtro

Una vez que la preparación está totalmente seca, observar al microscopio

PASOS EN LA TINCIÓN DE GRAM

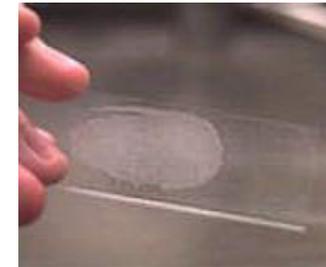
FROTIS Y FIJACIÓN



1.- Poner una gota de agua en un porta



2.- Tomar la muestra con el asa de siembra



3.- Extender sobre el agua y fijar a la llama del mechero

TINCIÓN



1.- Cubrir la preparación con Cristal Violeta 2'

Se coloca en primer término un colorante básico violeta (violeta de metilo, cristal violeta, violeta de genciana) que reacciona con TODAS las células bacterianas (Gram + y Gram -) coloreándolas de azul oscuro.



2.- Añadir Lugol (mordiente) durante 1'

- ✓ Se remueve el exceso de colorante con agua.
- ✓ Se cubre el extendido con Lugol, que es el mordiente que incrementa la afinidad entre el primer colorante y las células.
- ✓ Se combina con el colorante y forma un compuesto coloreado (complejo cristal violeta-yodo) en el interior de la célula.

- ✓ Este complejo es insoluble en H_2O , pero soluble en solventes orgánicos, por lo que una vez eliminado el excedente del mordiente con agua, se realiza la decoloración con alcohol-acetona
- ✓ Es decir la eliminación del complejo cristal violeta-yodo de aquellas bacterias que por las características de su envoltura son incapaces de retenerlo.



3.- Decolorar con ROH:Acet hasta que NO suelte colorante



4.- Lavar con agua

✓ Se lava para eliminar muy bien el decolorante.

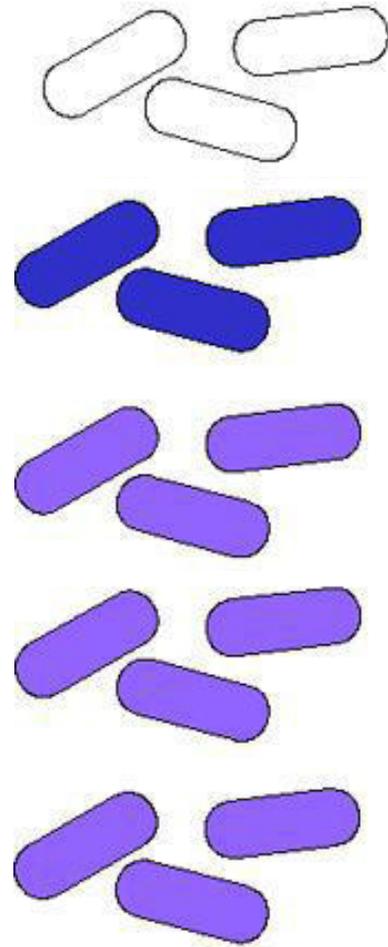
- ✓ Se coloca un colorante de contraste, igualmente de carácter básico pero de distinto color que el primer colorante, y que teñirá sólo a las bacterias decoloradas en el paso anterior.
- ✓ Se utiliza fucsina o safranina, de color rosa, que contrastan con el color violeta del primer colorante para poder distinguir los 2 tipos de células en el microscopio.



5.- Teñir con Safranina 1'



✓ Lavar con agua, dejar secar y observar al microscopio



Fijación



Cristal violeta



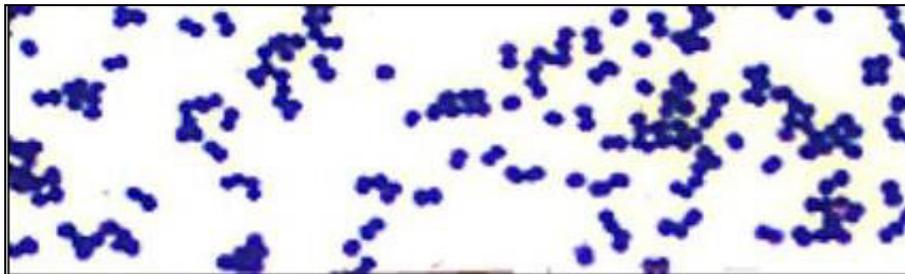
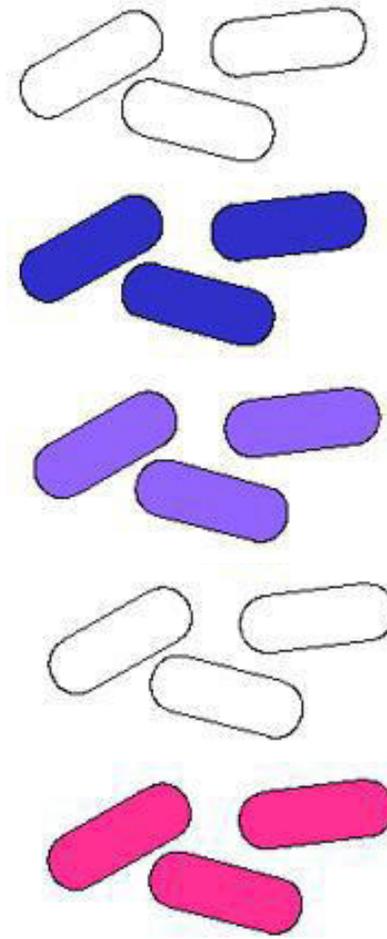
Lugol



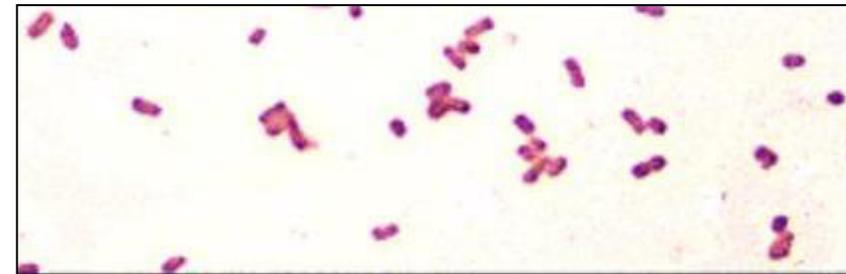
Decoloración



Contratinción con safranina

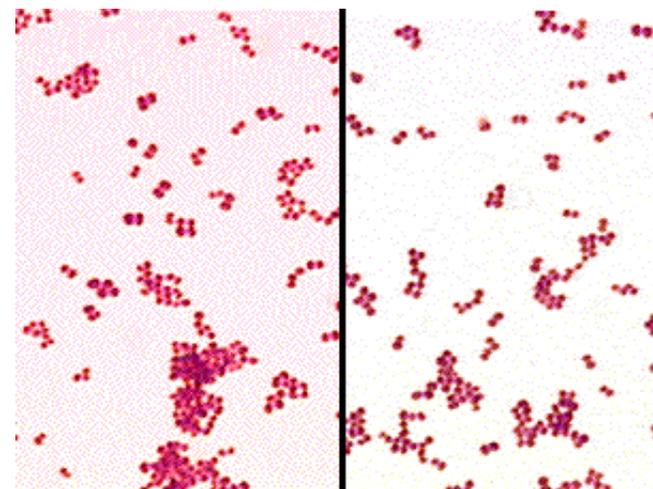
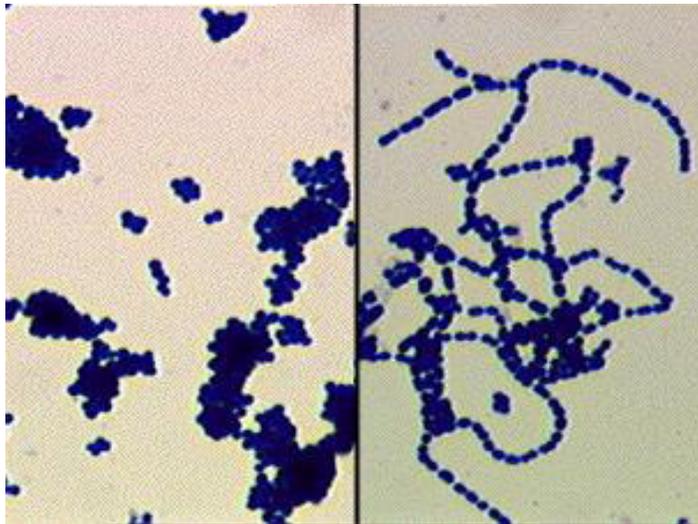
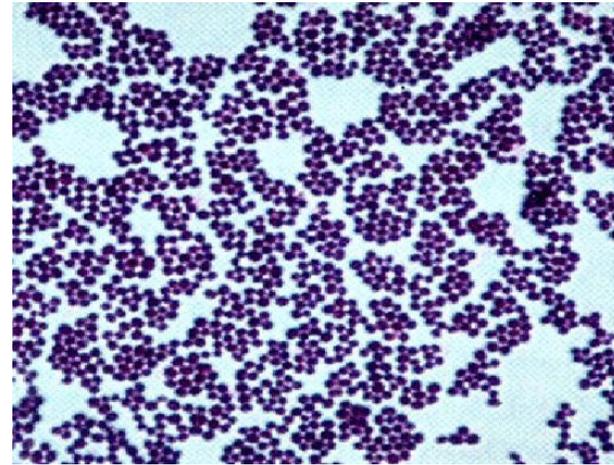
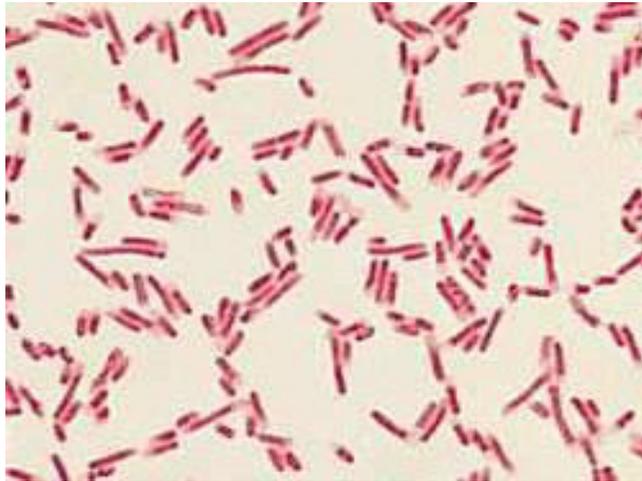


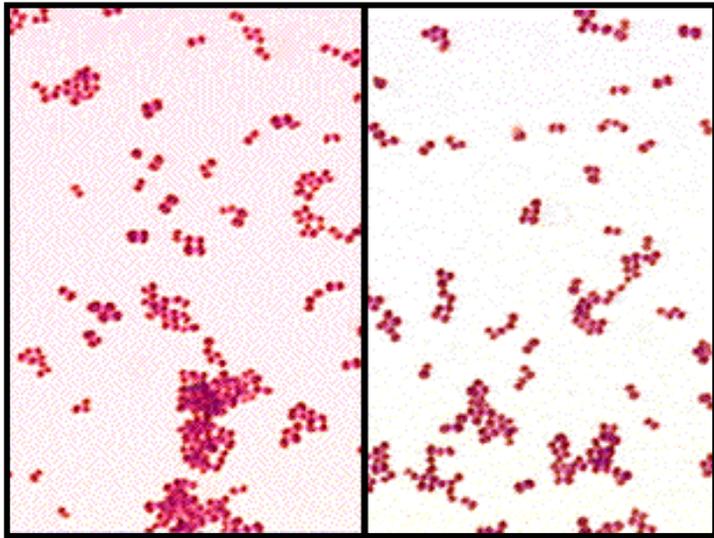
Staphylococcus aureus



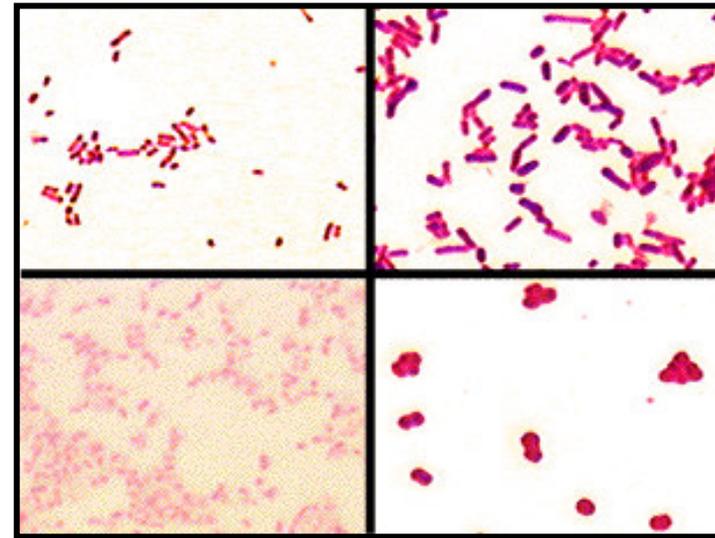
Escherichia coli

La tinción de Gram es uno de los procedimientos más útiles en los laboratorios de microbiología para empezar la identificación de procariotas

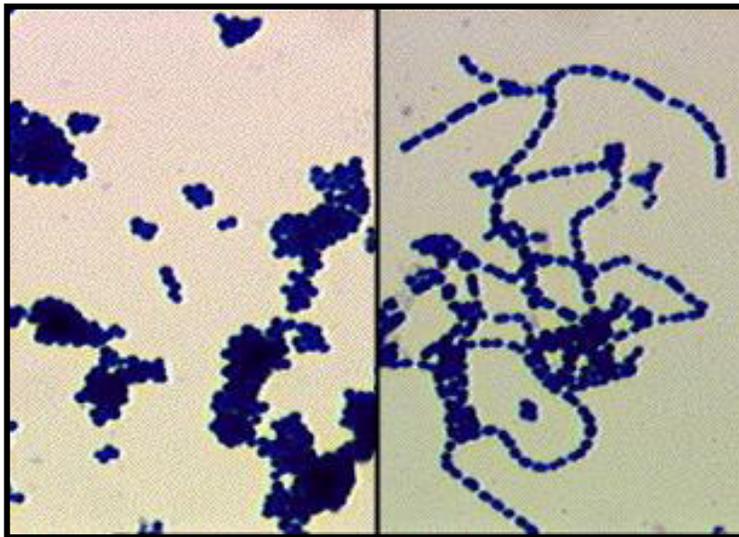




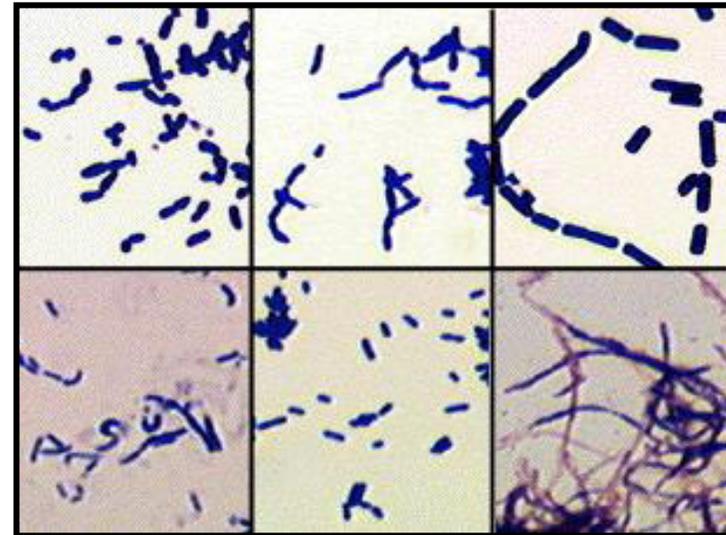
Cocos Gram -



Bacilos Gram -



Cocos Gram +



Bacilos Gram +

BACTERIAS GRAM +

- Se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram.
- Carece de espacio periplasmico
- Altamente sensibles a antibióticos β -lactámicos (Penicilina)
 - ✓ Estafilococos
 - ✓ Estreptococos
 - ✓ Bacilos (Mycobacteria Tuberculosis)

BACTERIAS GRAM -

- Se tiñen de color rosado tenue.
- Tiene espacio periplasmico
- Resistente a Penicilina
 - ✓ Neisseria (cocos)
 - ✓ Salmonelas (bacilos)
 - ✓ Treponema (espiroqueta)
 - ✓ Clamidia (pleomorfica)



A TENER EN CUENTA



- ❖ La decoloración es el paso más **CRÍTICO** del método de Gram.
- ❖ Una decoloración demasiado intensa o una decoloración insuficiente conduce a serios **ERRORES**.
- ❖ Como decolorante se pueden usar: etanol, una mezcla de etanol y acetona o acetona.
- ❖ La acetona por si misma actúa con rapidez excesiva, lo que puede resultar en decoloración incluso de aquellas bacterias capaces de retener el colorante, conduciendo a errores de interpretación.
- ❖ El etanol actúa mucho más lentamente y puede no llegar a decolorar las bacterias que no retienen el primer colorante.
- ❖ En consecuencia, lo mejor es emplear una mezcla de etanol y acetona (Etanol 70,5%:Acetona 29,5%).



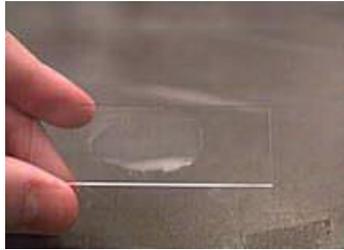
A TENER EN CUENTA



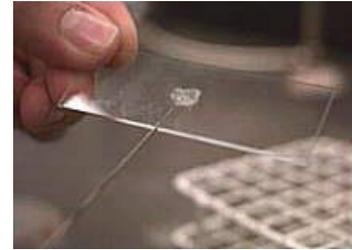
- ❖ Si se usa etanol como decolorante, hay que tener cuidado con su concentración.
- ❖ Si el grado alcohólico baja de 80° ($\approx 80\%$) aumenta su poder decolorante, en consecuencia, debe tenerse cuidado con la cantidad de agua que pueda quedar sobre el extendido en el momento de efectuar la decoloración.
- ❖ El comportamiento frente a la tinción Gram está influenciado por la edad del cultivo, ya que las Gram + pierden progresivamente la capacidad de retener el complejo violeta-iodo a medida que aumenta el periodo de incubación (de 24 a 48 hs).
- ❖ Es decir que es importante realizar la coloración utilizando cultivos frescos.
- ❖ Se ha observado que si se controlan estrictamente las condiciones (principalmente los tiempos de coloración), el grado de positividad frente a la coloración del Gram es una función de la especie bacteriana y es constante para cada especie.

TINCIÓN DE ESPORAS

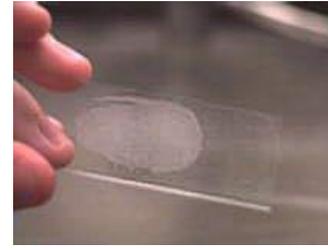
Frotis y fijación



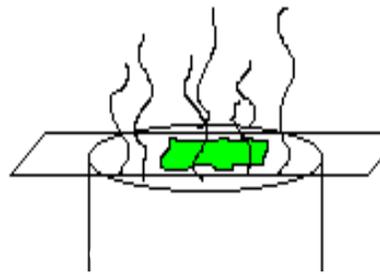
1.-Poner una gota de agua en un porta



2.-Tomar la muestra de un cultivo de *Bacillus*



3.-Extender sobre el agua y fijar a la llama del mechero



2.-Calentar, con un hisopo de algodón empapado en alcohol y prendido con la llama del mechero, hasta la emisión de vapores. Mantener caliente durante 5 minutos.



3.-Lavar con agua



4.-Teñir con Safranina 1'

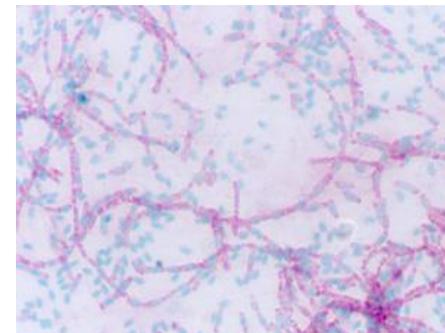
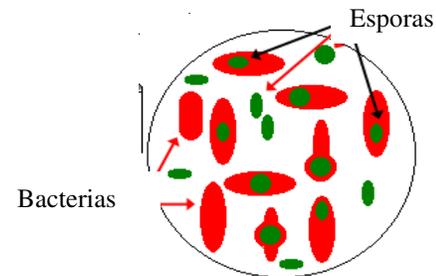


Tinción

1.-Cubrir la preparación con Verde Malaquita

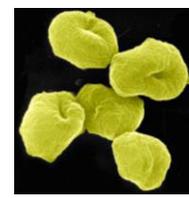


5.-Lavar con agua, dejar secar y observar al microscopio





PAREDES CELULARES DE ARQUEAS



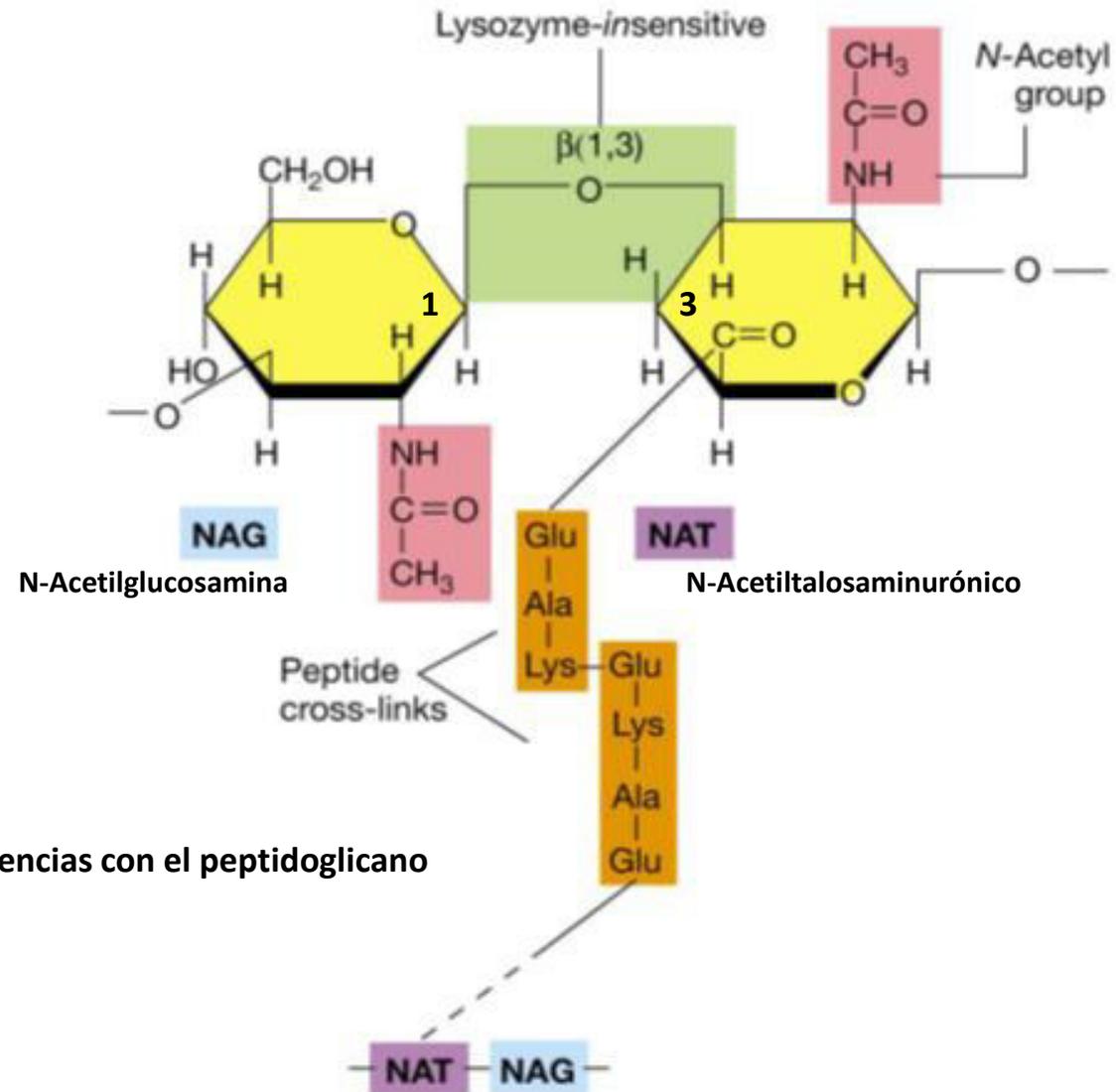
- ❖ El PEPTIDOGLICANO es la firma molecular en las paredes de BACTERIAS, pero que está AUSENTE en las paredes de ARQUEAS.
- ❖ Carecen de una membrana externa típica.
- ❖ Las paredes presentan una amplia variedad de composición química: polisacáridos, proteínas y glicoproteínas.

PSEUDOMUREÍNA o PSEUDOPEPTIDOGLICANO

- ❖ Polisacárido similar al peptidoglicano.
- ❖ Presente en las paredes de algunas metanogénas.
- ❖ El esqueleto de pseudomureína lo forman unidades alternativas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetiltalosaminurónico, que reemplaza al ácido N-acetilmurámico del peptidoglicano.
- ❖ Los enlaces glicosídicos entre las unidades son β -1,3 (en vez de β -1,4).
- ❖ Todos los aminoácidos se presentan en forma de estereoisómeros.
- ❖ Es probable que hayan surgido por evolución CONVERGENTE después de que los 2 dominios procariotas se separaran
- ❖ O que existan por DIVERGENCIA a partir de un polisacárido común presente en las paredes de las células procarióticas antes de la separación evolutiva de los dominios *Archaea* y *Bacteria*.

ESTRUCTURA DE LA PSEUDOMUREÍNA

Polímero de la pared celular de *Methanobacterium*



Tiene semejanzas y diferencias con el peptidoglicano

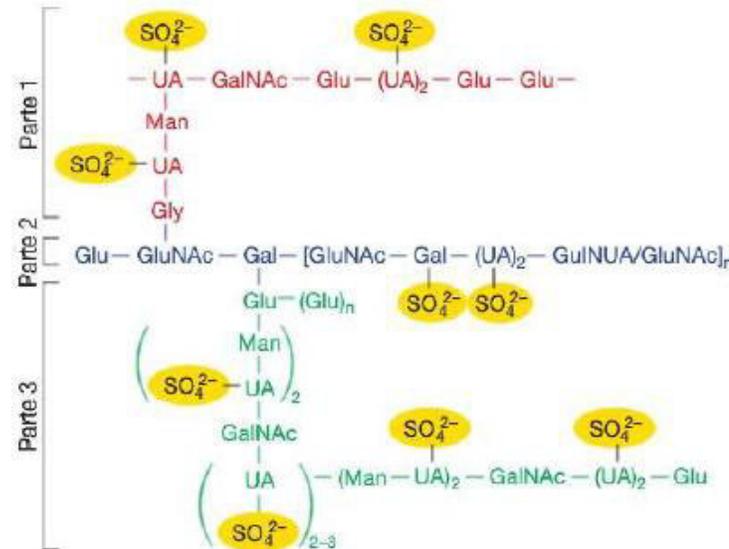
OTROS POLISACÁRIDOS DE LAS PAREDES DE ARQUEAS



Las paredes de otras arqueas carecen de pseudomureína y contienen otros polisacáridos.

- ❖ *Methanosarcina* posee paredes celulares gruesas compuestas por glucosa, ácido glucurónico, galactosamina y acetato.
- ❖ Arqueas halófilas extremas, como *Halococcus* tienen paredes celulares semejantes a las de *Methanosarcina* pero contienen además sulfato (SO_4^{2-}), que con su carga negativa establece enlaces con el Na^+ presente en estanques de evaporación de sal y mares y lagos salinos.
- ❖ Esto favorece la estabilización de la pared celular en ambientes tan polares.
- ❖ *Methanosarcina* y los halófilos extremos están filogenéticamente relacionados, por lo que las similitudes en la estructura de sus paredes no son sorprendentes.

Estructura de la pared celular de *Halococcus*



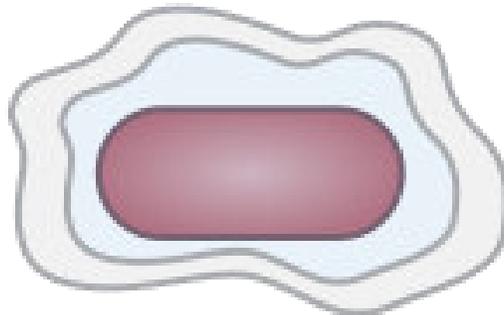
EXOPOLISACÁRIDOS

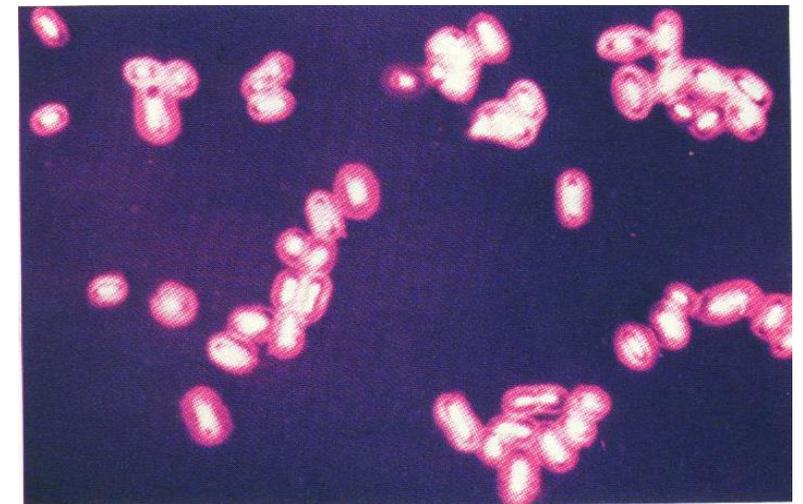
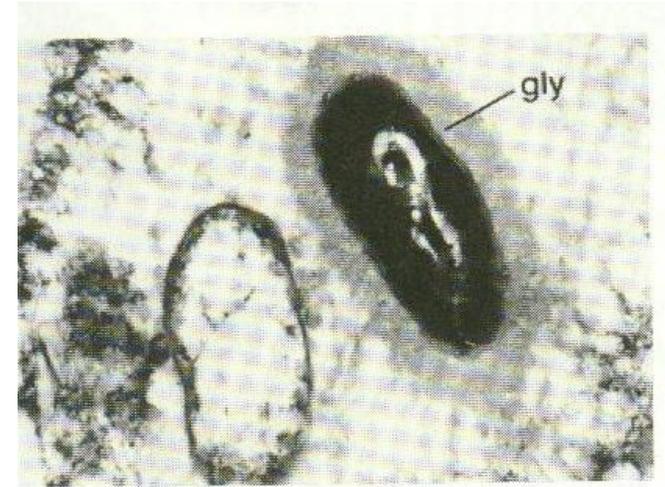
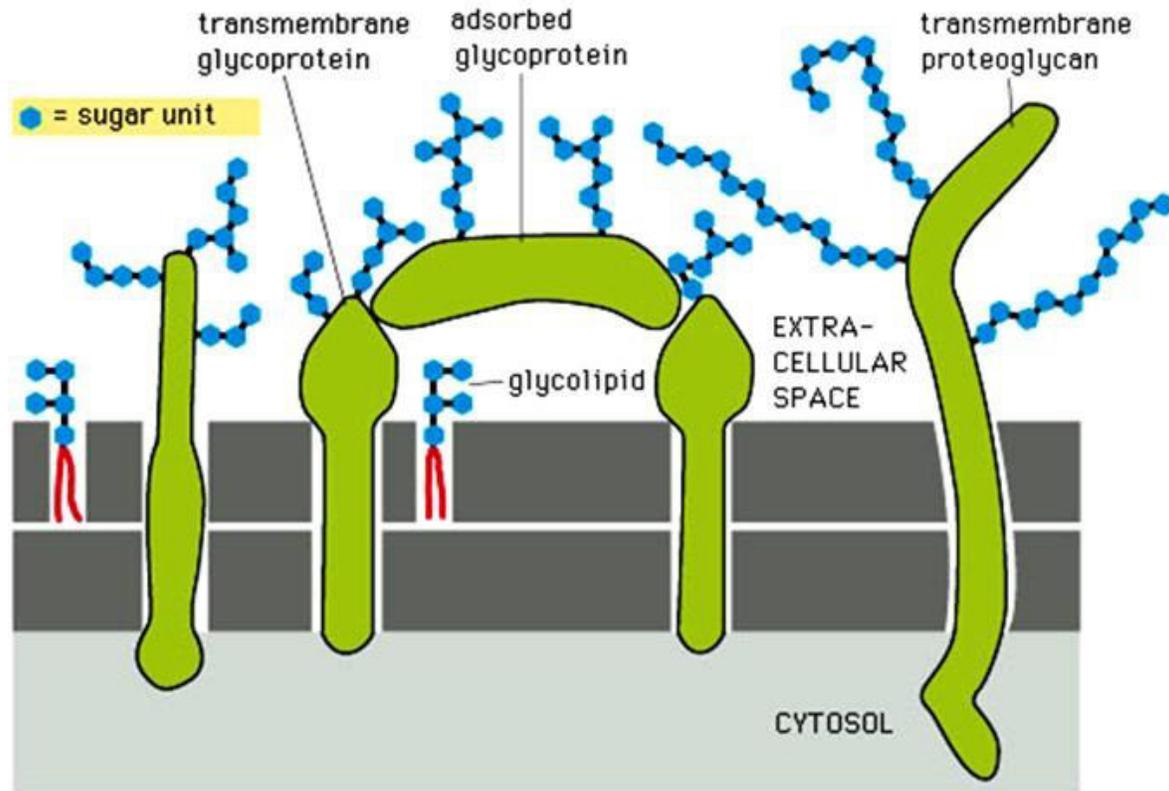


- ❖ Cubierta de naturaleza polisacárida producida por algunas bacterias que las rodea
- ❖ Se clasifican en:
 - Glucocálix o Glicocalix.
 - Capsula.

GLICOCÁLIX, GLUCOCÁLIX: material exudado polimérico extracelular compuesto por proteínas y carbohidratos.

- Fuera de la pared celular de la bacteria.
- Es un material extracelular que se deforma con facilidad, no tiene límites definidos y se une de forma laxa a la bacteria.



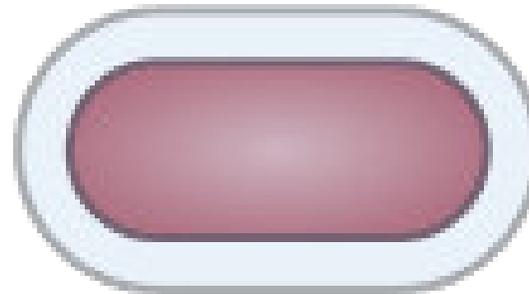




CÁPSULA



- A diferencia del glucocálix, es una estructura organizada, con límites definidos y unida firmemente a la bacteria.
- Protege a las bacterias contra los fagocitos.
- Ayuda en la formación de biopelículas (*biofilms*) sobre superficies inertes como dientes o rocas.
- Tiene la propiedad de fijar agua, evitando que la célula se seque.





CÁPSULAS MICROBIANAS: NATURALEZA, COMPOSICIÓN Y FUNCIONES

Además de las paredes celulares, las células procarióticas pueden tener otras capas o estructuras más externas en contacto con el medio

CAPAS SUPERFICIALES, PELOS Y FIMBRIAS

- ❖ Muchas células procarióticas secretan materiales viscosos en su superficie: polisacáridos o proteínas.
- ❖ Estos materiales no se consideran parte de la pared celular porque no aportan ninguna resistencia estructural significativa para la célula.
- ❖ Pueden ser gruesas o finas, rígidas o flexibles, dependiendo de su composición y su grado de hidratación.
- ❖ Se llaman **CÁPSULA** y **CAPA MUCOSA**.

CAPA MUCOSA

Capa difusa de fibras de polímeros, generalmente polisacáridos, que rodean la célula

CÁPSULA

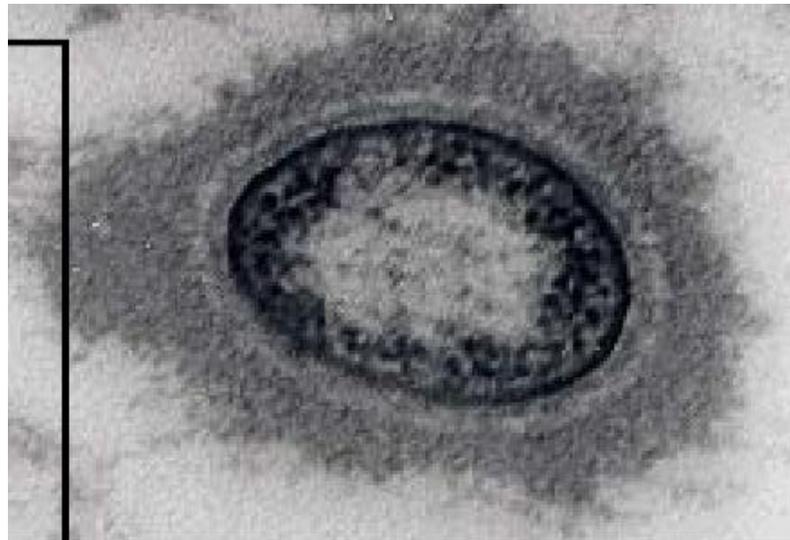
Capa densa y bien definida, de polisacárido o de proteína, que rodea la célula

CAPA MUCOSA



- ❖ Material fácilmente deformable más difícilmente observable
- ❖ No tan fijadas a la pared celular
- ❖ Pueden desprenderse de la superficie celular

- ❖ Los patógenos que penetran en el cuerpo de los animales se unen primero de modo selectivo a componentes superficiales de los tejidos del hospedador.
- ❖ Esto es mediado por los polisacáridos superficiales de la bacteria.
- ❖ Muchas bacterias no patógenas también se unen en la naturaleza a superficies sólidas formando a veces una gruesa capa de células que se llama biofilm.



CÁPSULA



- ❖ Sustancia mucosa o viscosa.
- ❖ Naturaleza polisacáridica o peptídica
- ❖ No siempre presente (depende del medio de cultivo)
- ❖ Propiedades antifagocíticas
- ❖ Factor de virulencia

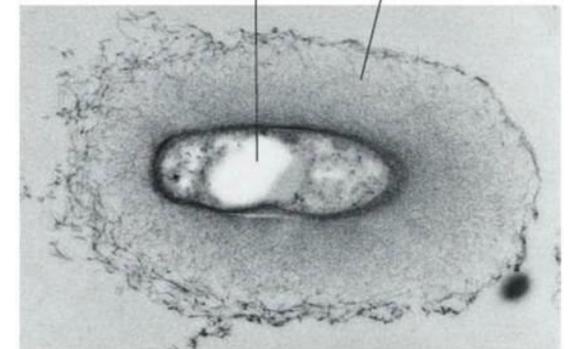
- ✓ Debido a estructura fibrilar hidratada gruesa, no se tiñen con tinciones habituales (tinta china)
- ✓ La tinta china no penetra en la cápsula y resalta esta estructura como un área clara que rodea a la célula, que aparece más oscura

Cápsulas de *Acinetobacter*



(a)

Célula Cápsula



Corte fino de una célula de *Rhizobium trifolii*

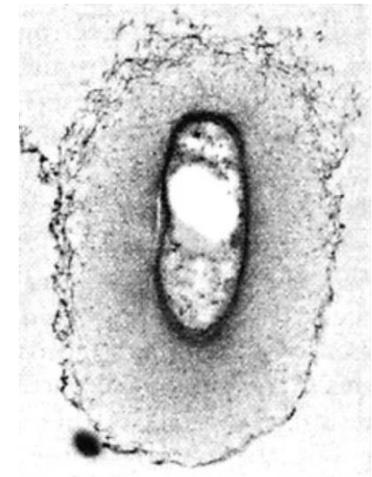
CARACTERISTICAS

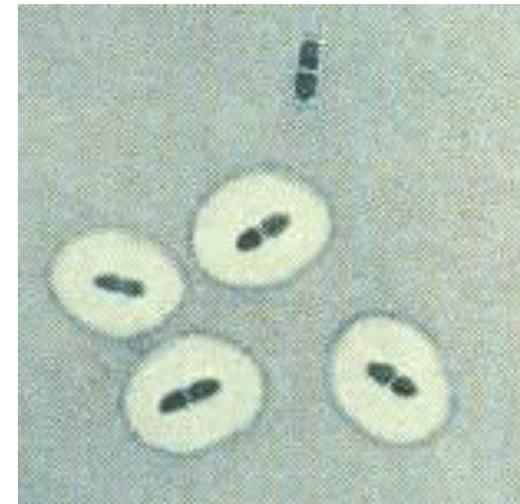
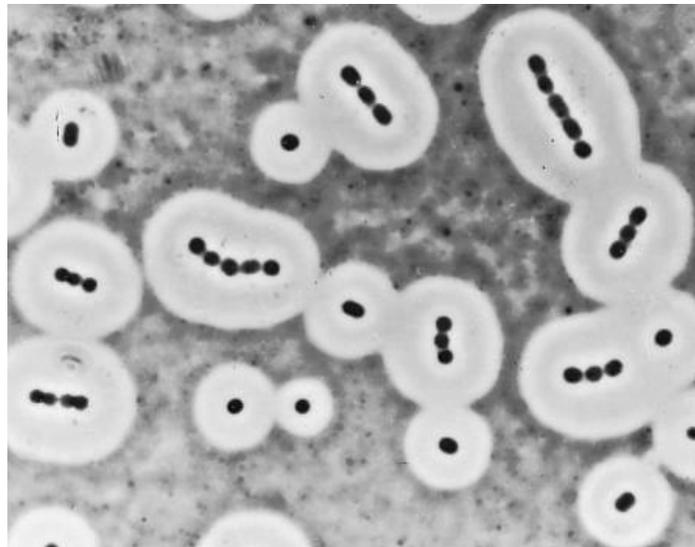
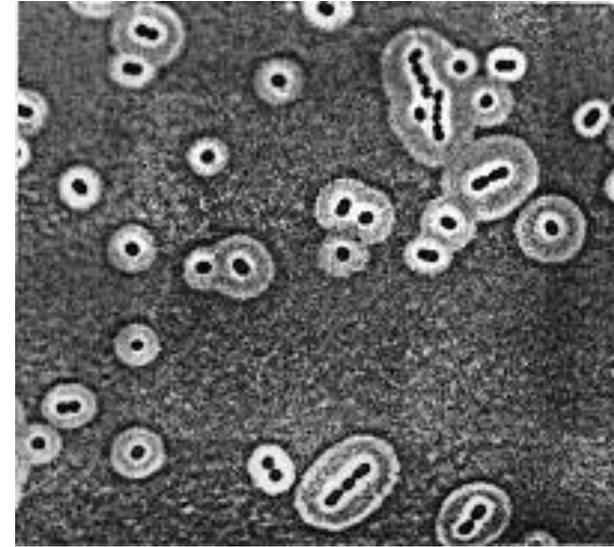
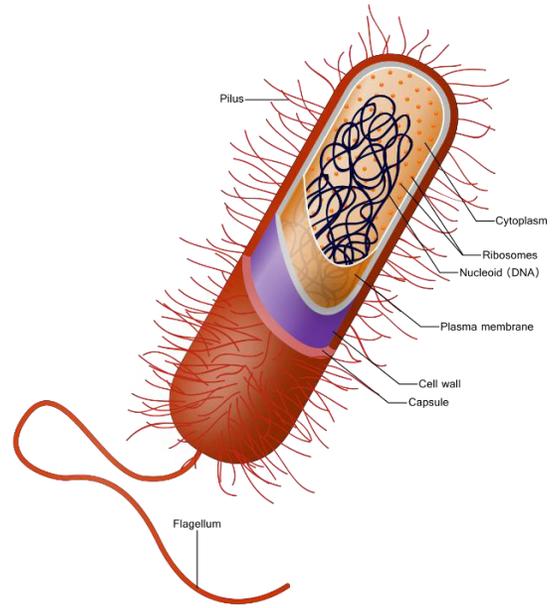


- ❖ Presente en la mayoría de las patógenas
- ❖ Estructuras amorfas dispensables, que cubren la bacteria y sin la cual sobreviven, aunque pueden perder la capacidad patogénica.
- ❖ Unidas firmemente a la pared celular
- ❖ Están compuestas de polisacáridos, secretados por las propias bacterias.
- ❖ Su composición varía en cada organismo y puede ser rígida o flexible, fina o gruesa
- ❖ Glucosa y otros: *Streptococcus pneumoniae*, Glucosa: *Bacterias entéricas*, Sacarosa: · glucosa (dextranos): *Streptococcus*, fructosa (levanos): *Pseudomonas*
- ❖ Existe la excepción de la cápsula de *Bacillus anthracis*, formada por polipéptidos de ácido glutámico.

FUNCIONES

- ✓ Fijación bacteriana.
- ✓ Reconocimiento de puntos de ingreso al hospedador.
- ✓ Resistir la acción de células fagocitarias y anticuerpos del sistema inmunitario.
- ✓ Retención de agua (protege de la desecación).



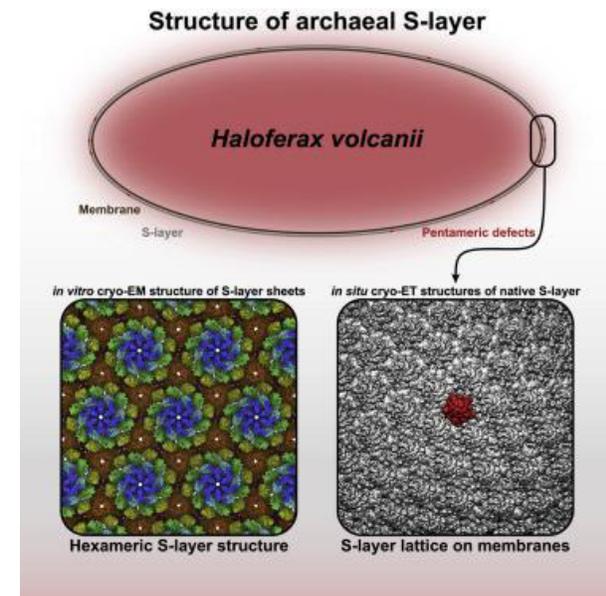


Streptococcus pneumoniae

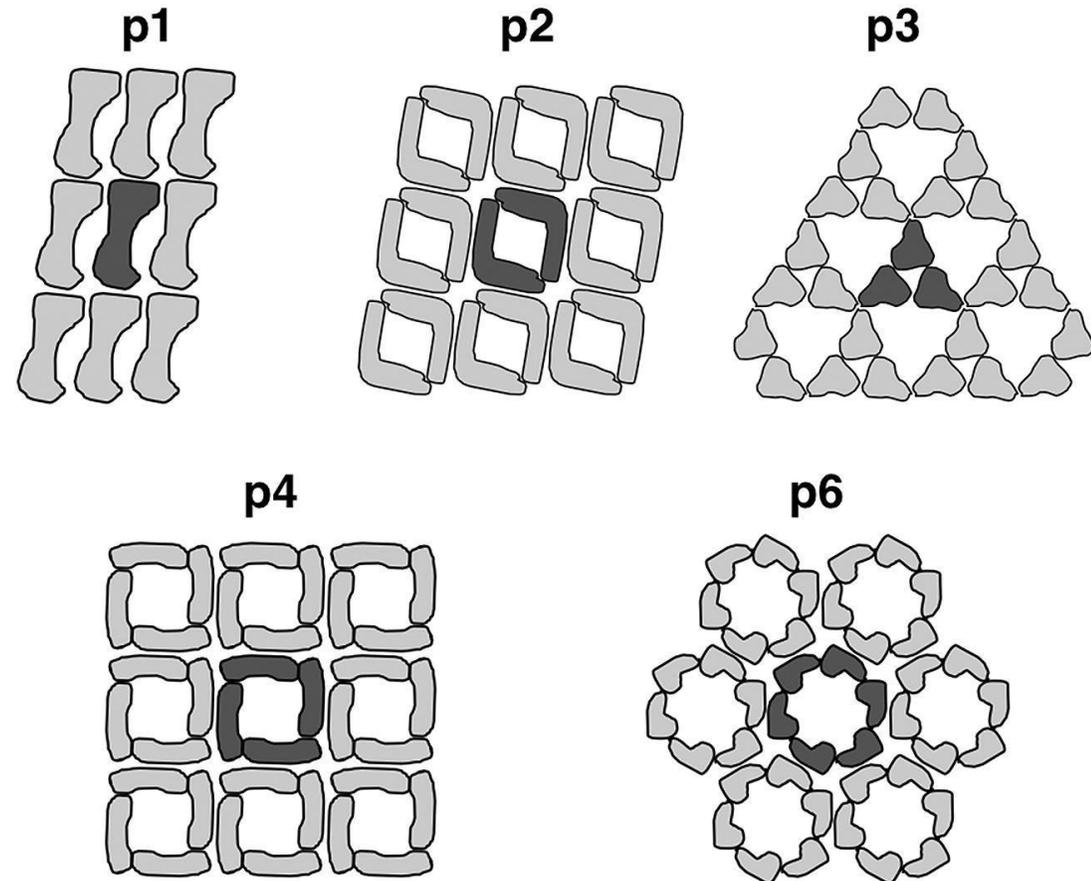
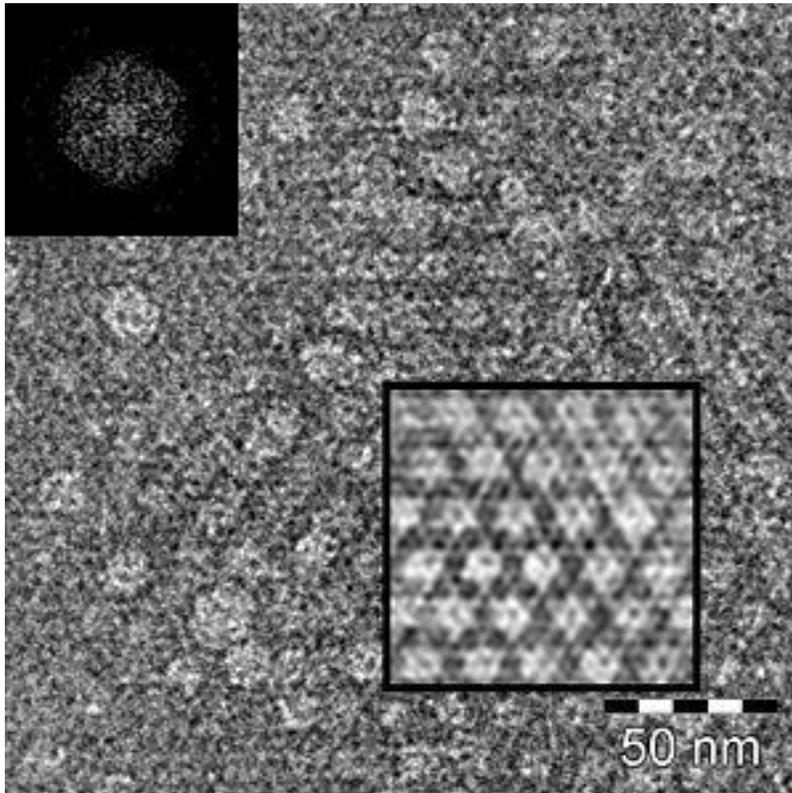
CAPAS S



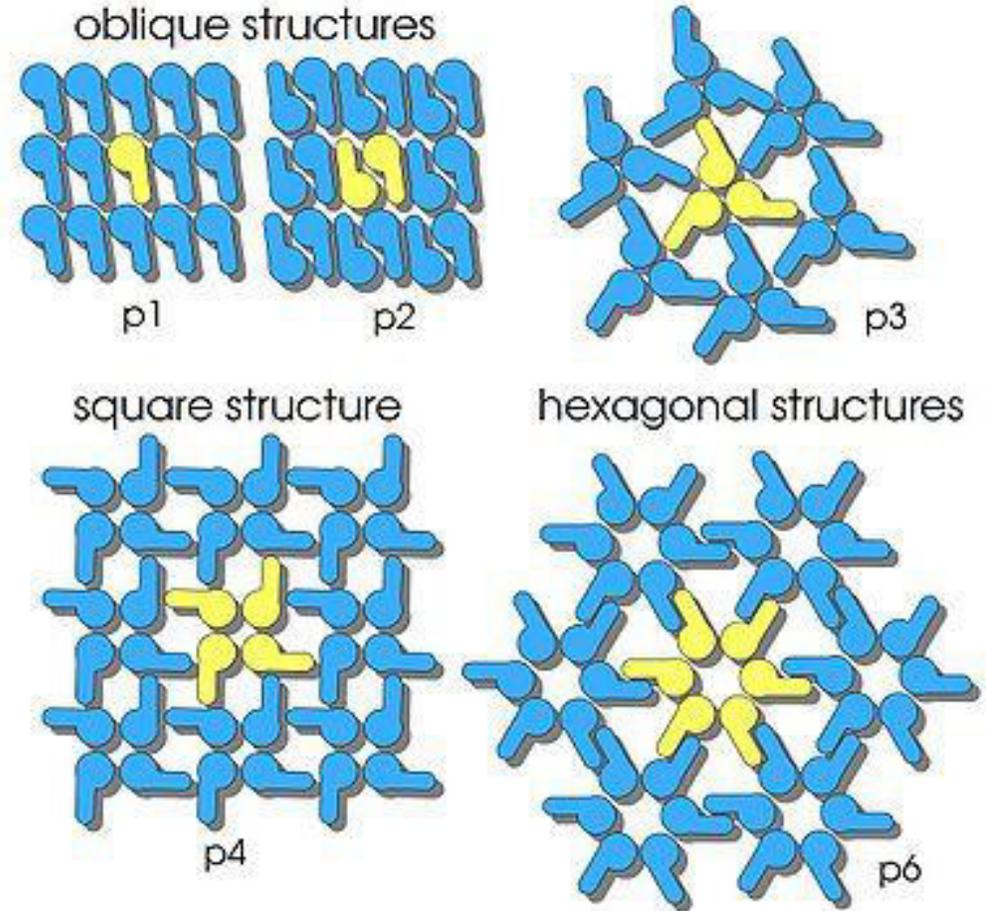
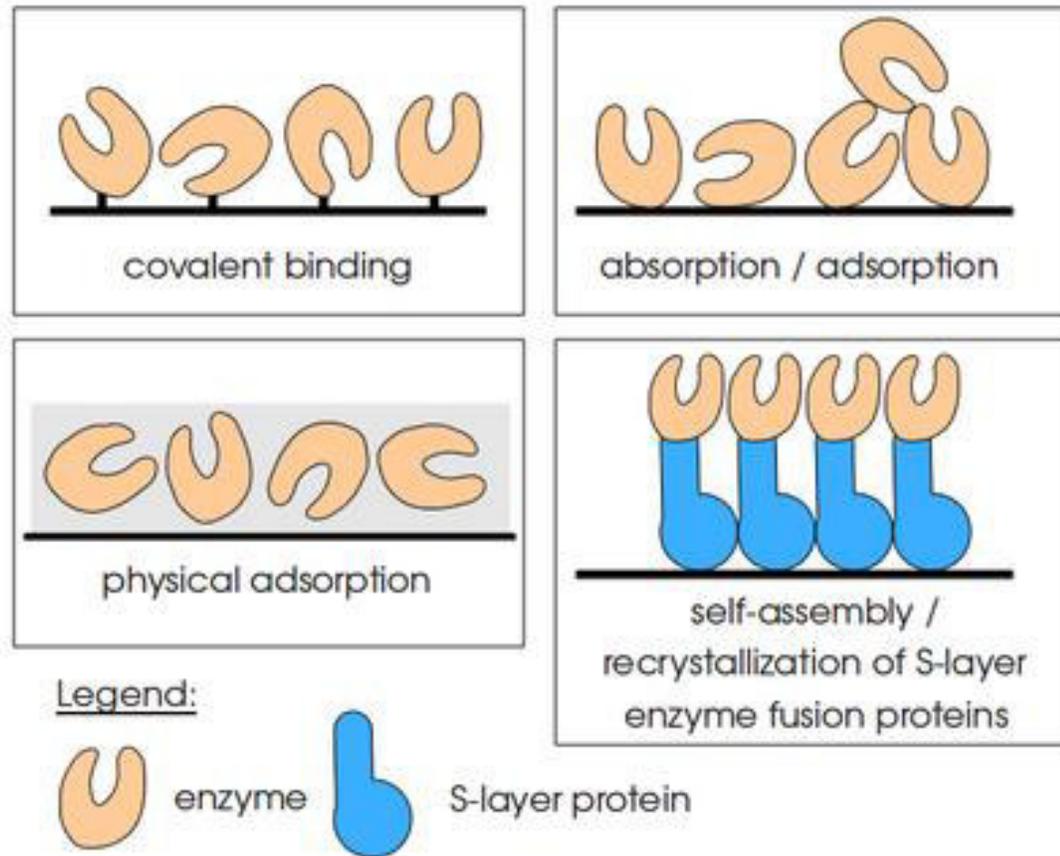
- ❖ Capa superficial paracristalina de algunas bacterias y arqueas compuesta por proteínas o glicoproteínas y que muestra un aspecto ordenado y monomolecular.
- ❖ Es el tipo más común de pared entre las arqueas.
- ❖ La estructura paracristalina de las capas S se dispone siguiendo varias simetrías: hexagonal, tetragonal o trimérica, dependiendo del número y tipo de subunidades proteicas o glicoproteicas que las componen.
- ❖ La capas S se han encontrado en prácticamente todos los grupos de arqueas (halófilos extremos, metanógenos, hipertermófilos).
- ❖ Algunas bacterias también presentan capas S en sus superficies más externas.
- ❖ Las pared celular del metanógeno *Metanococcus jannaschii*, están compuesta de una sola capa S, siendo lo suficientemente resistentes como para evitar la lisis osmótica.
- ❖ Siempre que se presenta una capa S además de pared celular, corresponde a la estructura más externa.
- ❖ Es probable que actúen como filtros selectivos que permitan el paso de sustancias de bajo peso molecular y que excluyan grandes moléculas y estructuras (como virus).
- ❖ También pueden retener a proteínas cerca de la superficie celular, de modo semejante a como hace la membrana externa en las bacterias Gram -.



- ❖ Las capas de proteínas superficiales (capas S) a menudo forman el único componente estructural de la pared celular de arqueas y, por lo tanto, son importantes para la supervivencia celular.
- ❖ Las capas S tienen una gran cantidad de funciones celulares que incluyen el mantenimiento de la forma celular, la estabilidad osmótica y mecánica, la formación de una barrera protectora semipermeable alrededor de la célula y la interacción célula-célula, así como la adhesión de la superficie.



A pesar de la importancia de las capas S para la vida de las arqueas, su arquitectura tridimensional (3D) aún no se conoce bien.



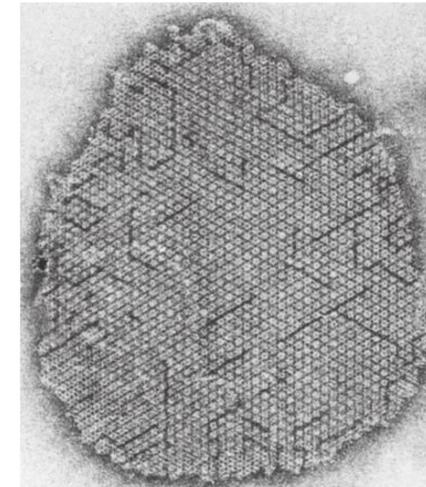
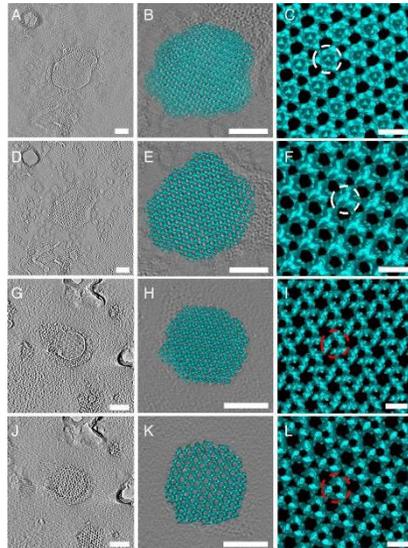
FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA CAPA S PARACRISTALINA

- ❖ Protección contra bacteriófagos y fagocitosis
- ❖ Resistencia a pH ácido
- ❖ Barrera contra sustancias de alto peso molecular.
- ❖ Adhesión
- ❖ Estabilización de la membrana.
- ❖ Provisión de sitios de adhesión para exoproteínas.
- ❖ Provisión de un compartimento periplásmico en Gram+ junto con el peptidoglicano y las membranas citoplasmáticas

ESTRUCTURAS PARACRISTALINAS DE LA CAPA S

Simetría hexagonal

Sulfolobus



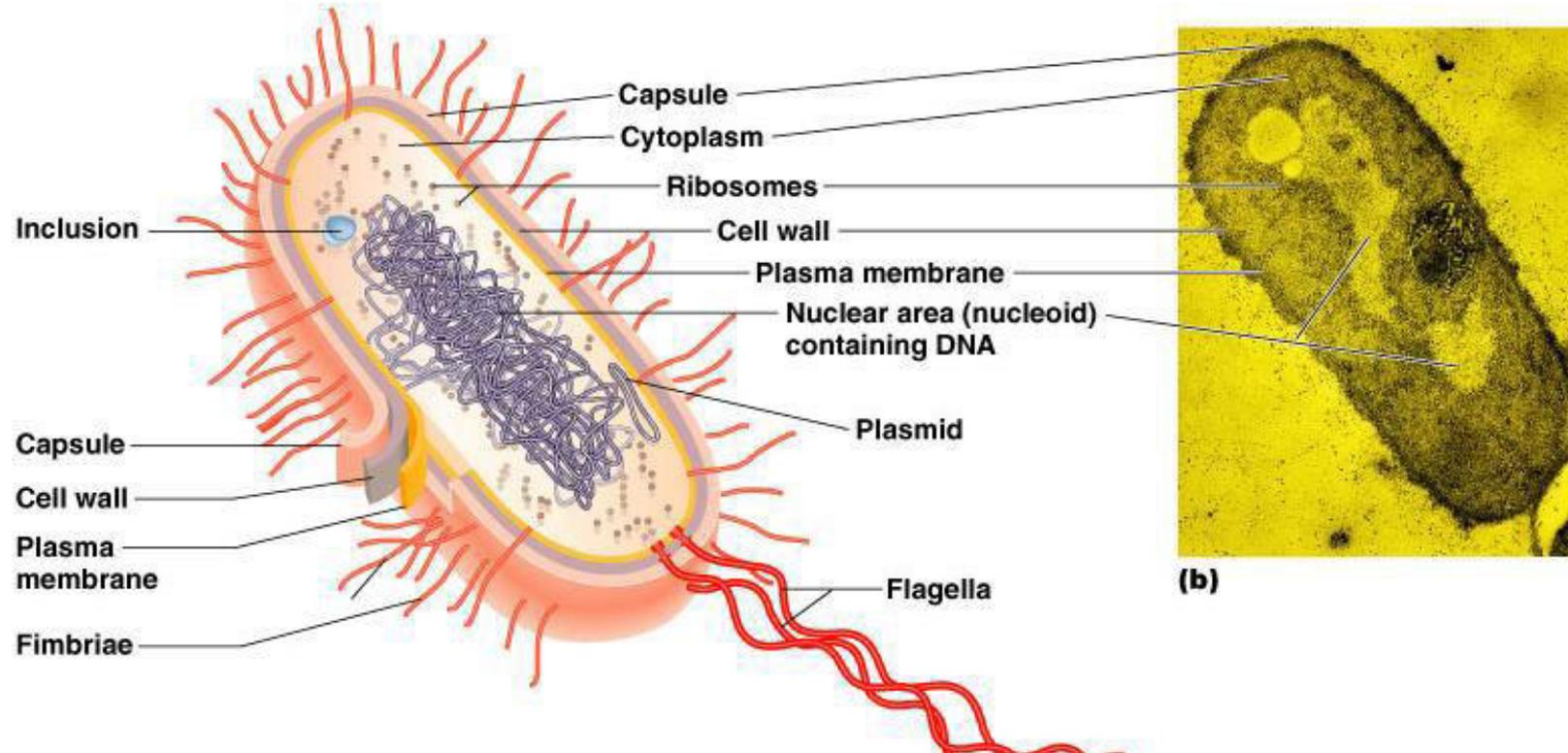
Aquaspirillum serpens

ESTRUCTURAS CONSTANTES

- Pared celular
- Membrana plasmática
- Citoplasma (ribosomas, inclusiones, ADN)

ESTRUCTURAS ACCESORIAS

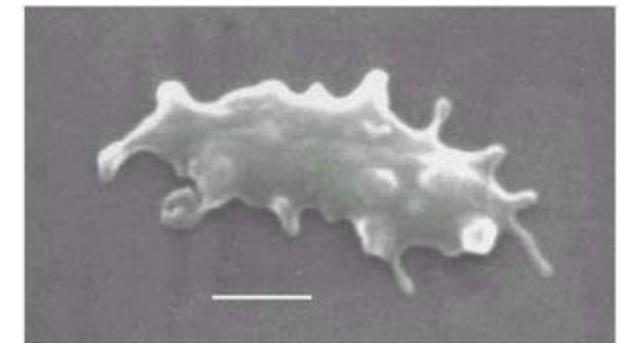
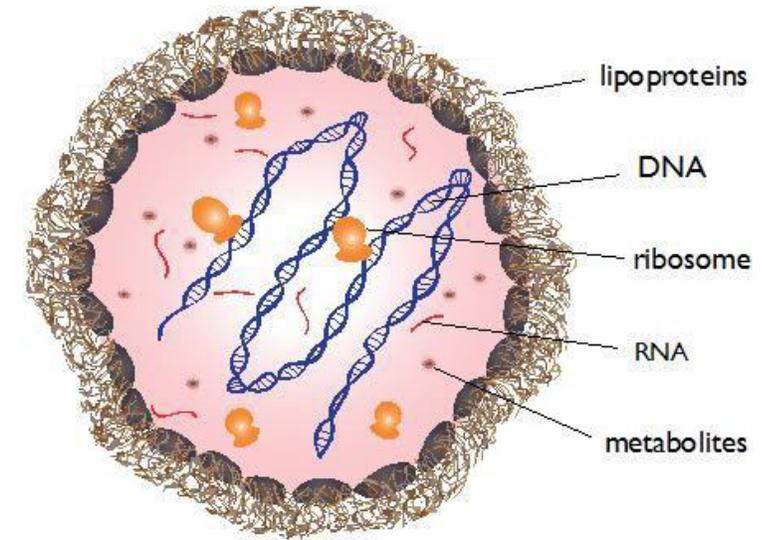
- Flagelos, Fimbrias, pili
- Exopolisacáridos(Cápsula y glicocalix)
- Formación de espora



FORMAS SIN PARED CELULAR



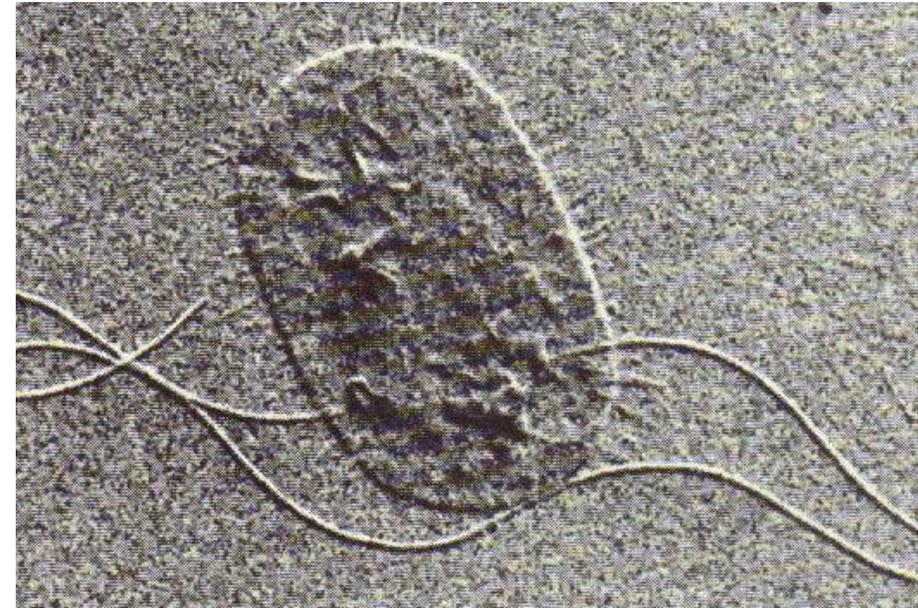
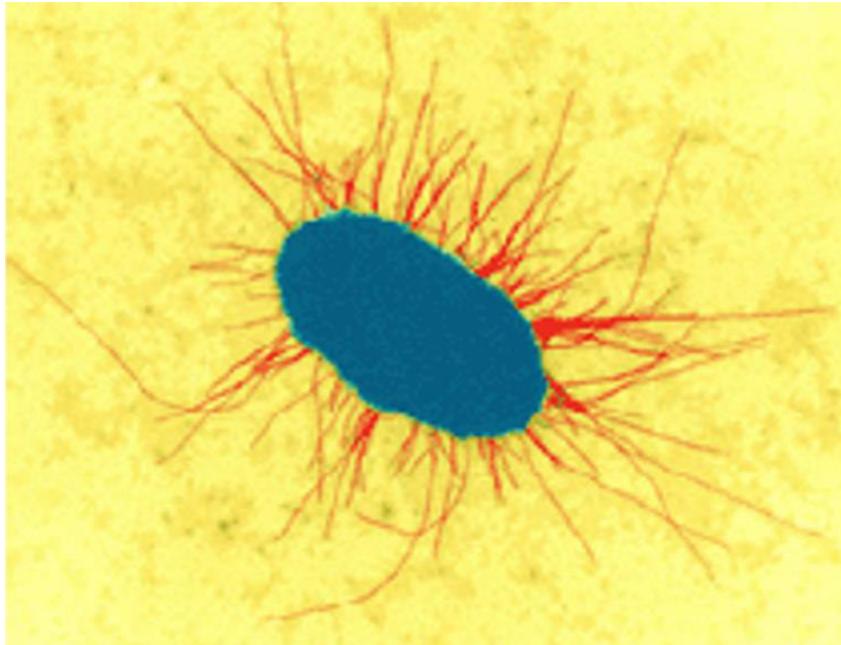
- ❖ Aunque la mayoría de los procariotas no pueden sobrevivir en la naturaleza sin sus paredes celulares, algunos son capaces de hacerlo.
- ❖ Los **MICOPLASMAS** son un grupo de bacterias patógenas que causan diversas enfermedades infecciosas en el hombre y en otros animales y el grupo de **THERMOPLASMA**, que son Arqueas.
- ❖ Estos procariotas son capaces de sobrevivir **SIN** paredes celulares debido a que tienen membranas citoplásmicas muy **GRUESAS** poco comunes o a que viven en ambientes osmóticamente protegidos, como el interior del cuerpo humano.
- ❖ La mayoría de los micoplasmas tienen **ESTERÓLES** en sus membranas citoplasmáticas que probablemente funcionan como elementos de fuerza y rigidez, de modo similar a la función que desarrollan en las membranas de las células eucarióticas



APENDICES PROCARIOTAS

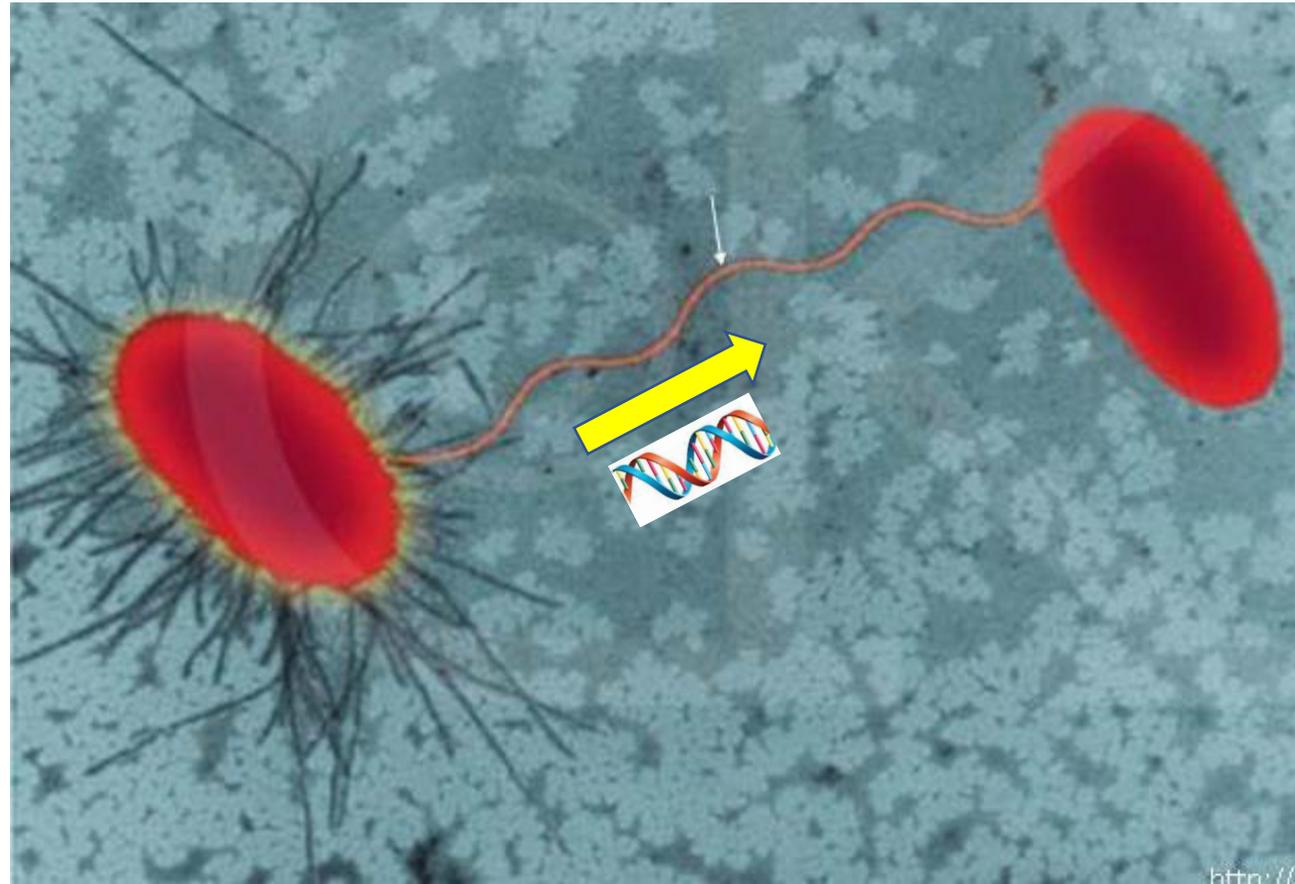
FIMBRIA o PILI

Filamento proteico corto, involucrado en funciones de adhesión a superficies



FIMBRIAS Y PILI

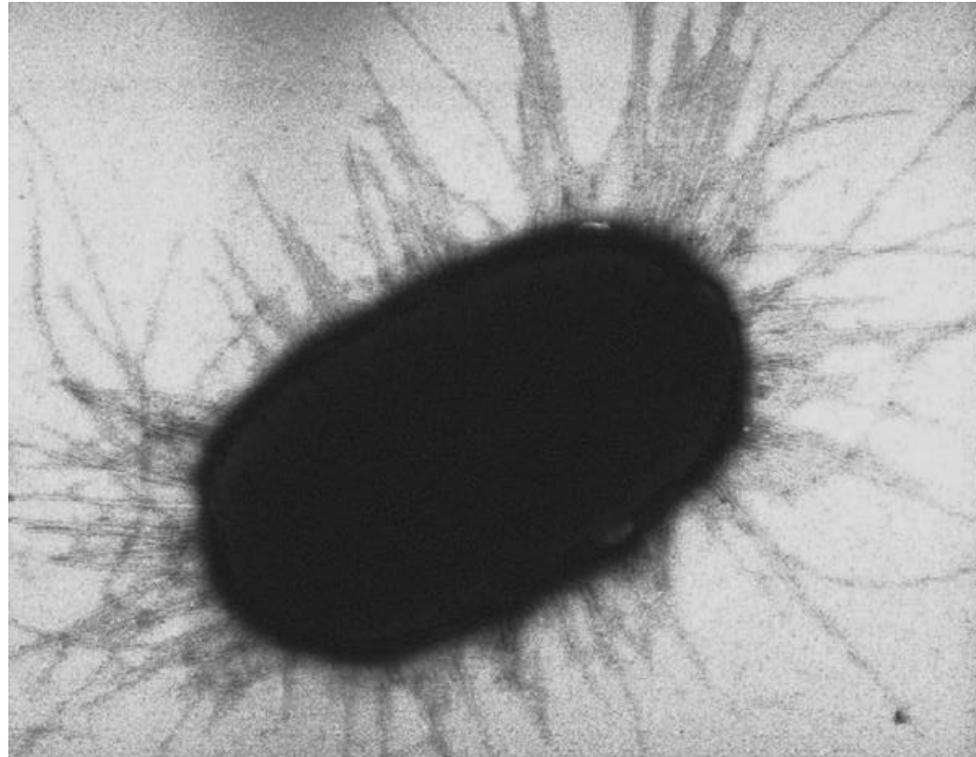
- ❖ Filamentos huecos, delgados y rectos.
- ❖ Situados en la superficie de algunos microorganismos.
- ❖ Su función NO esta relacionada con la locomoción.
- ❖ Esta relacionada con la adherencia a los substratos
- ❖ El pili sexual esta relacionado al intercambio de fragmentos de ADN durante la conjugación



FIMBRIAS

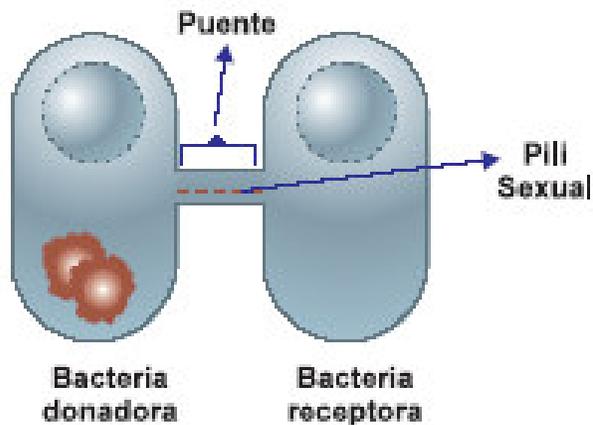
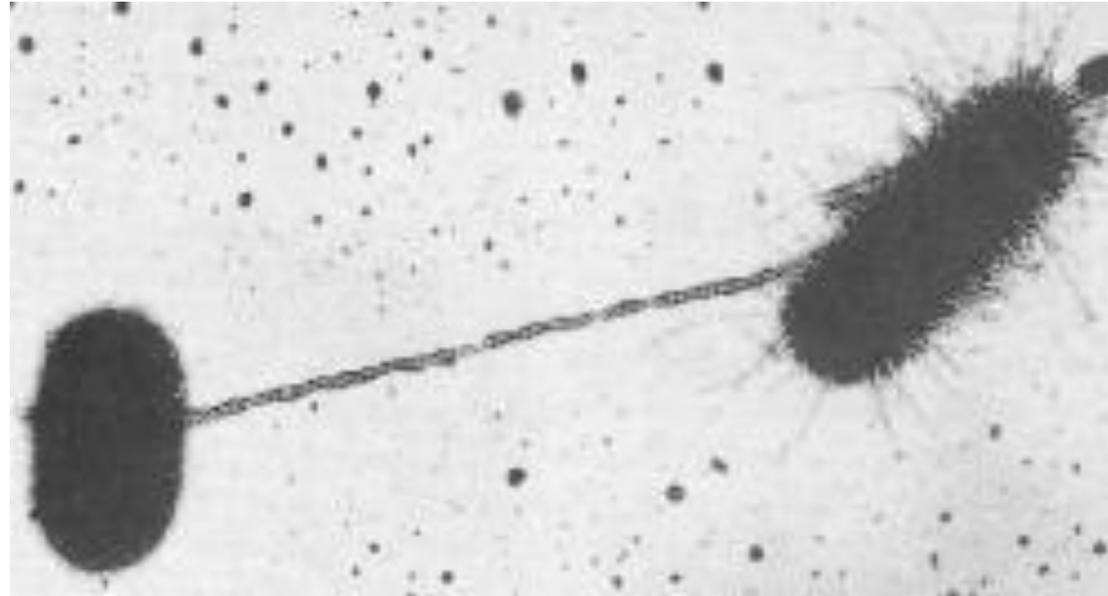
Pelos cortos que utilizan las bacterias para adherirse a las superficies

- **Constituidas por el ensamblaje de una proteína estructural “pilina”.**
- **Posee propiedades de adhesina.**



PILI SEXUAL

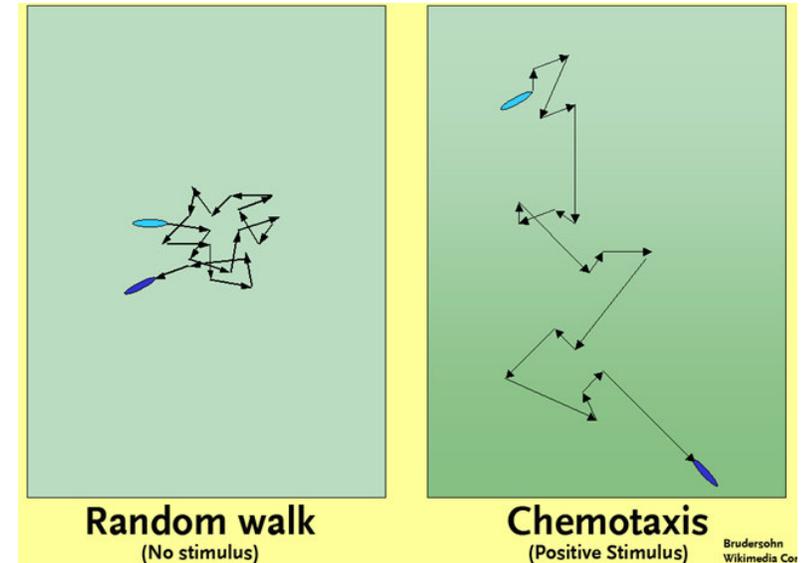
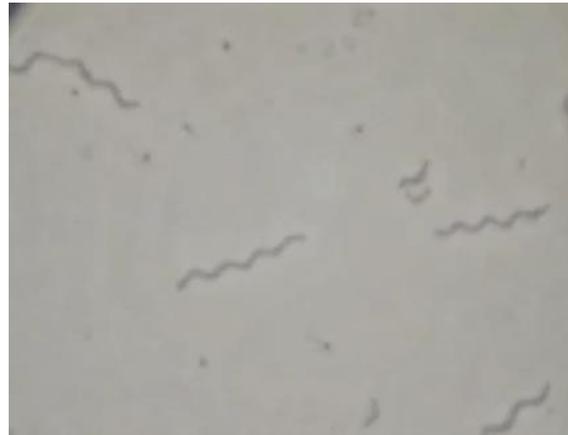
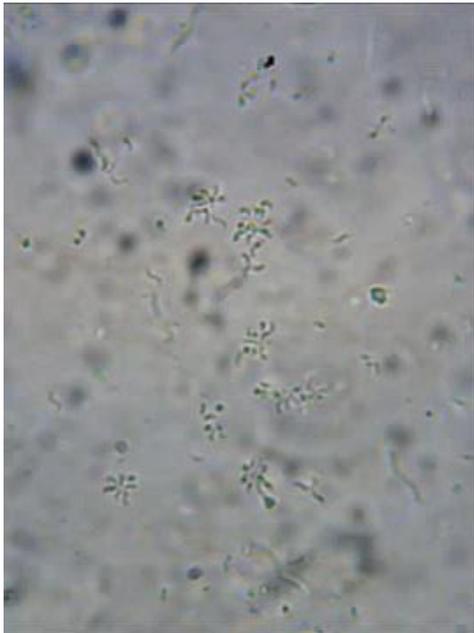
Pelo sexual para la unión a una célula receptora durante la conjugación



- ❖ Son mas largos.
- ❖ 2 - 3 por célula.
- ❖ Se comportan como adhesinas.
- ❖ Intercambio génico entre bacterias en la conjugación

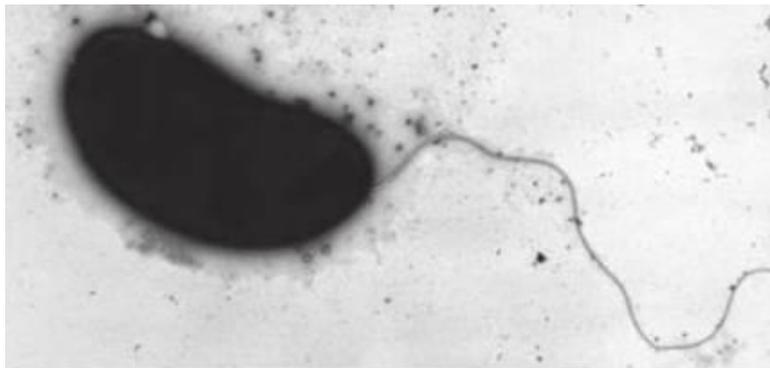
MOVILIDAD PROCARIOTA

- ❖ Muchas células pueden moverse por sí mismas, y la movilidad les permite desplazarse hasta alcanzar diferentes partes de su medio
- ❖ En la lucha por la supervivencia, una distinta localización puede ofrecer a la célula nuevos recursos y oportunidades que suponen la diferencia entre la vida y la muerte
- ❖ Las células móviles son capaces de dirigirse a estímulos particulares o alejarse de ellos: **TAXISMO**

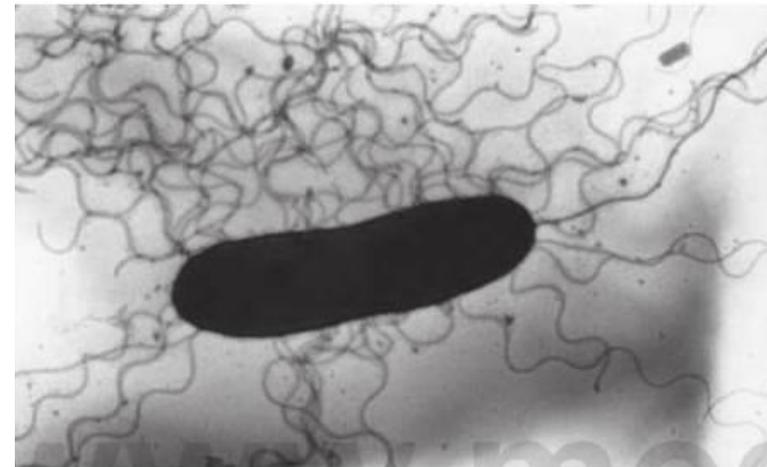


FLAGELOS EN BACTERIAS

- ❖ Apéndices filamentosos helicoidales para la movilidad bacteriana.
- ❖ Presentes solo en bacilos.
- ❖ Formado por: cuerpo basal, un gancho y un filamento externo de flagelina.
- ❖ Son apéndices largos y finos que se encuentran libres por un extremo y unidos a la célula por el otro.
- ❖ Como son tan finos (15-20 nm de grosor), un flagelo individual sólo es visible por microscopía óptica después de una tinción especial que aumenta su diámetro.
- ❖ Sin embargo, los flagelos se observan fácilmente por microscopía electrónica.

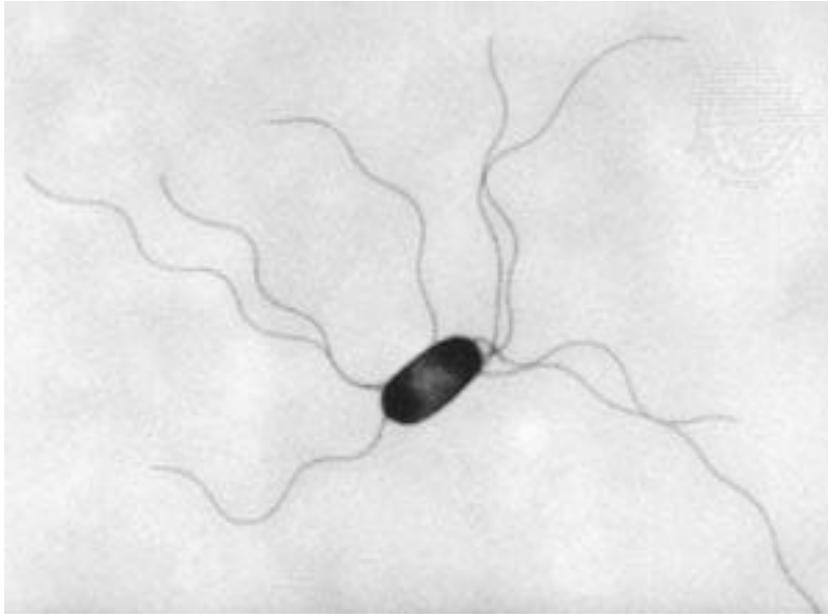


(a)



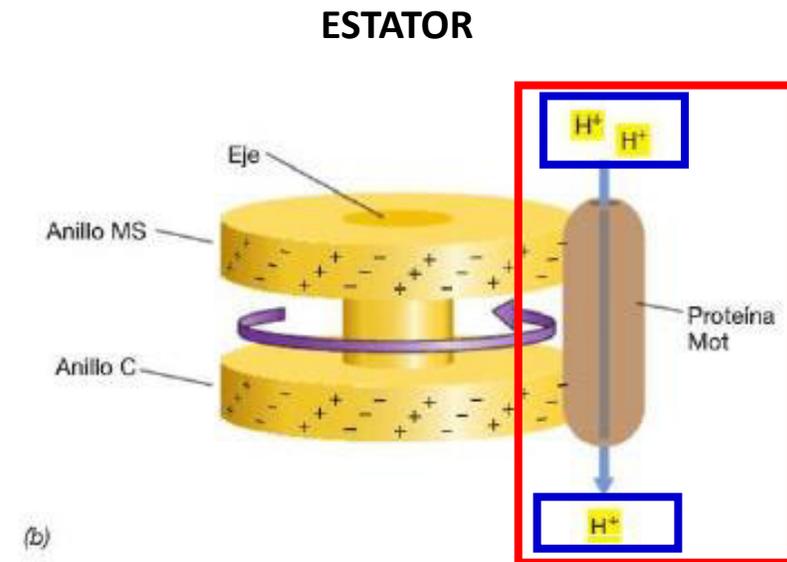
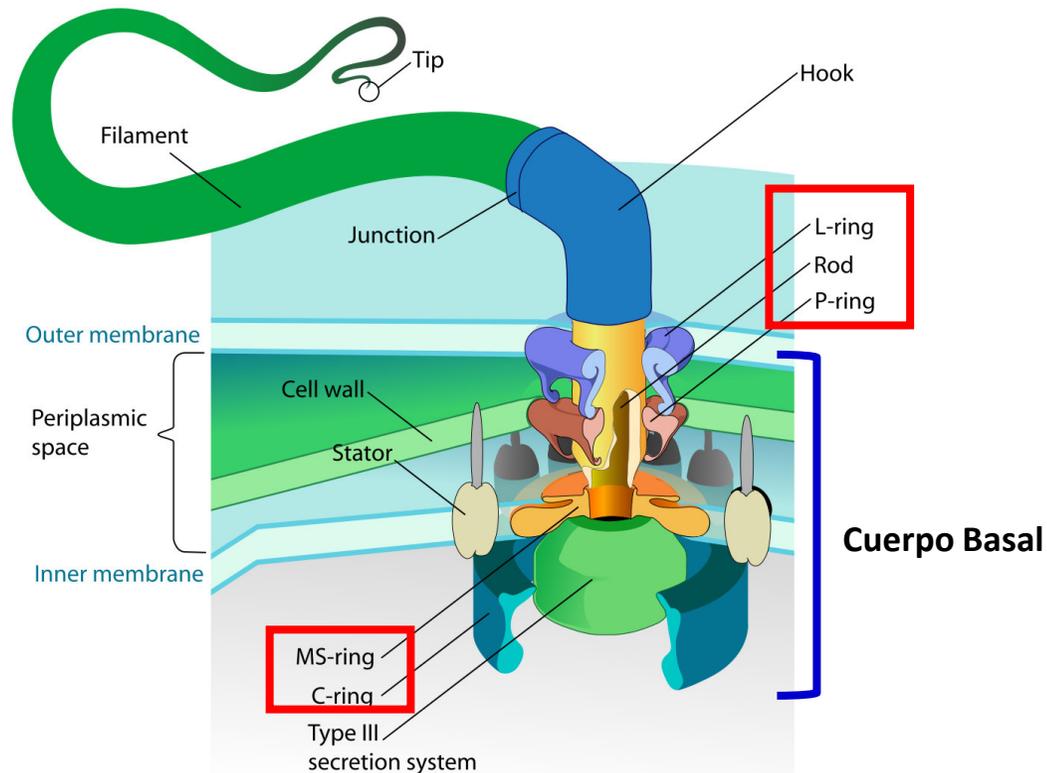
FLAGELOS EN BACTERIAS

- ❖ Son de mayor longitud que la bacteria.
- ❖ En numero y disposición variable.
- ❖ Formados por fibrillas proteicas compuestas de una proteína llamada FLAGELINA

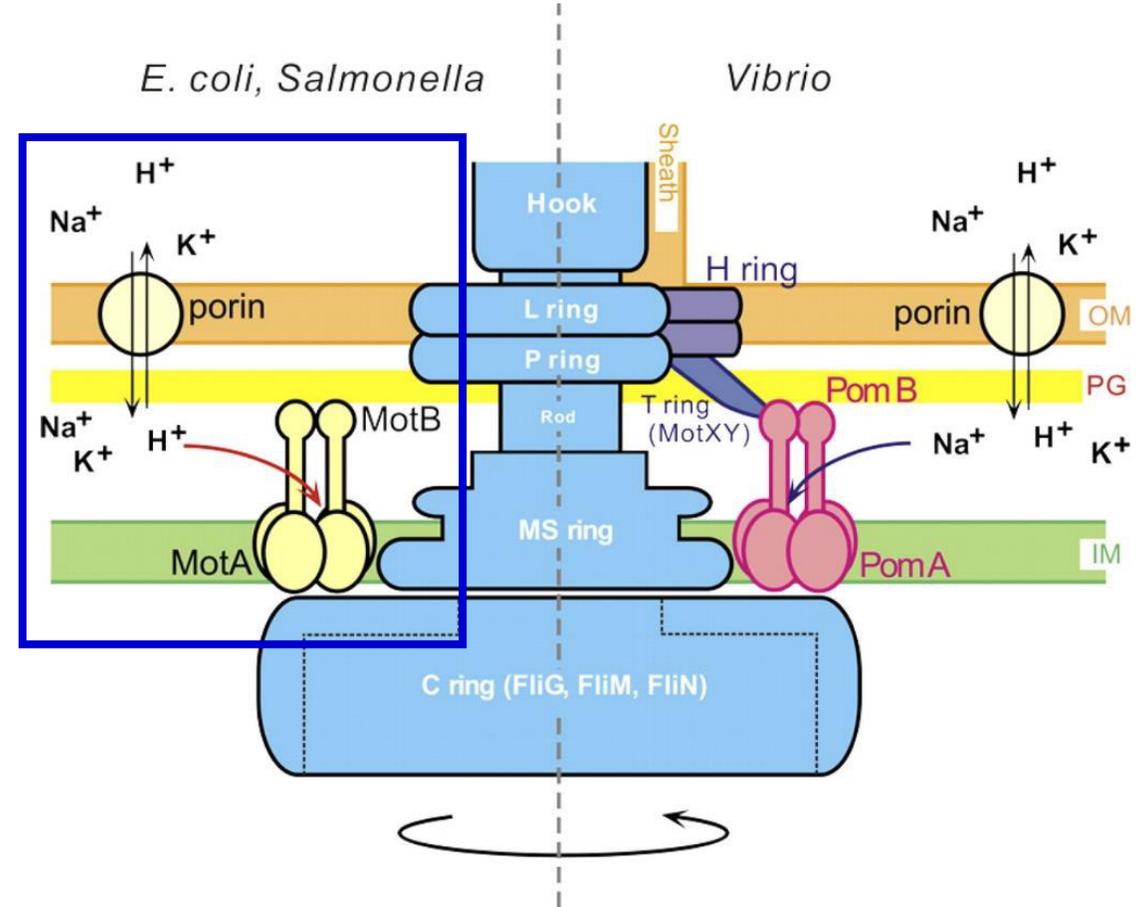


MOVIMIENTO FLAGELAR

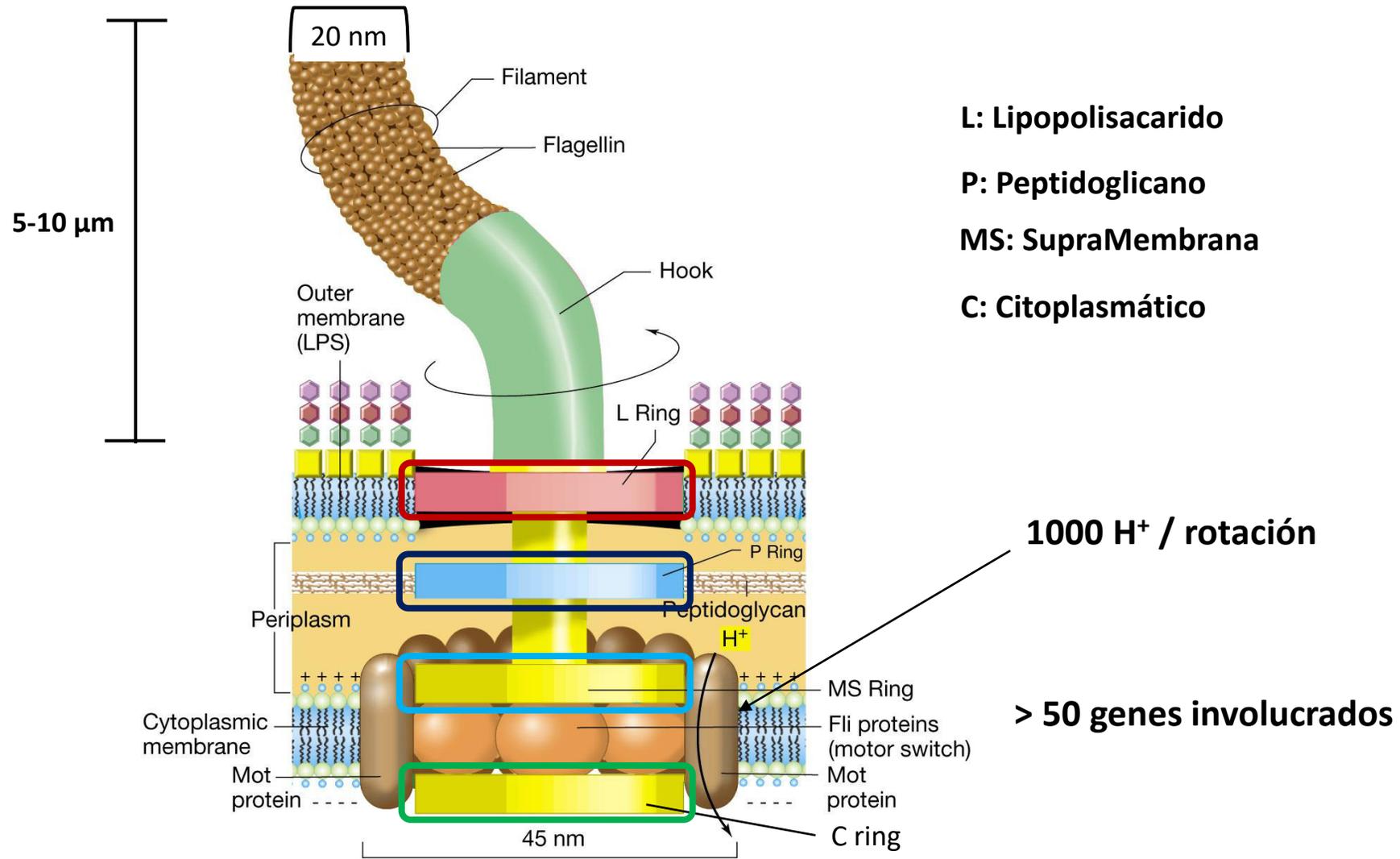
- ❖ El flagelo es un pequeño motor rotatorio con 2 componentes principales: el ROTOR y el ESTATOR.
- ❖ En el motor flagelar, el rotor está compuesto por el eje central y los anillos L, P, C y MS que componen el cuerpo basal.
- ❖ El estator está representado por las proteínas Mot que rodean al cuerpo basal.
- ❖ El movimiento rotatorio del flagelo lo proporciona el cuerpo basal.
- ❖ La energía requerida para la rotación procede de la fuerza motriz de H^+ .



- ❖ El flujo de H^+ a través de la membrana citoplasmática se realiza por el complejo Mot que impulsa la rotación del flagelo.
- ❖ Se estima que por cada rotación del flagelo se translocan aproximadamente 1.000 H^+ .
- ❖ Se ha propuesto un modelo de «turbina de H^+ » según el cual los H^+ que fluyen por canales a través del estator ejercen fuerzas electrostáticas sobre cargas de las proteínas del rotor que están dispuestas helicoidalmente.
- ❖ Las atracciones entre las cargas + y - originan que el cuerpo basal rote a medida que los H^+ pasan por el estator.

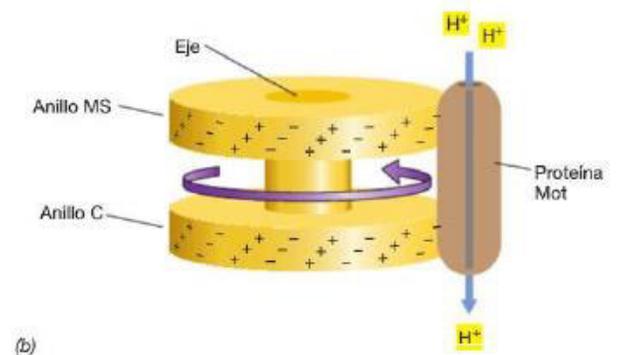
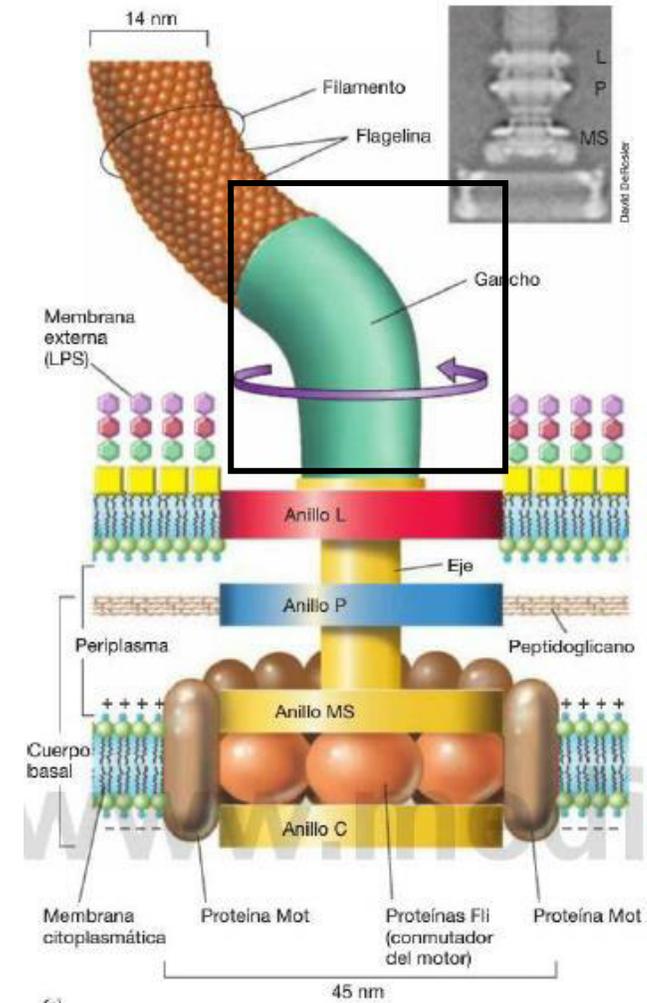


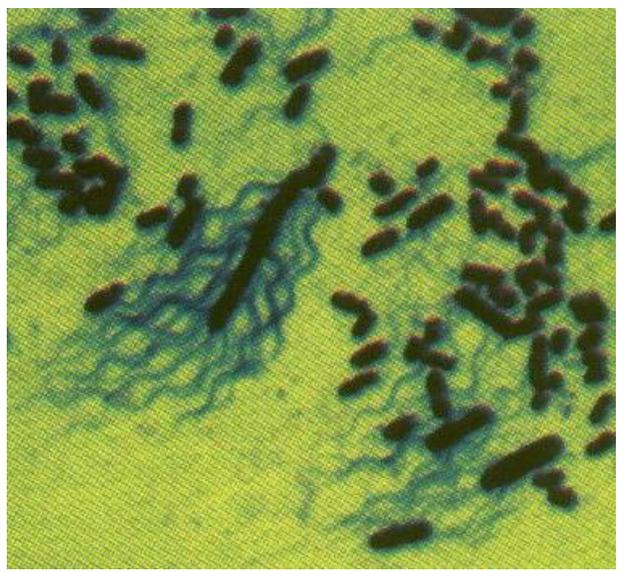
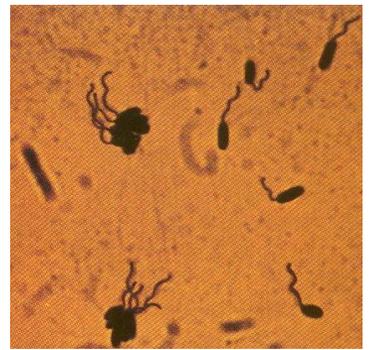
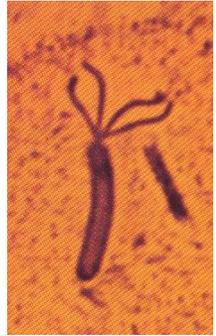
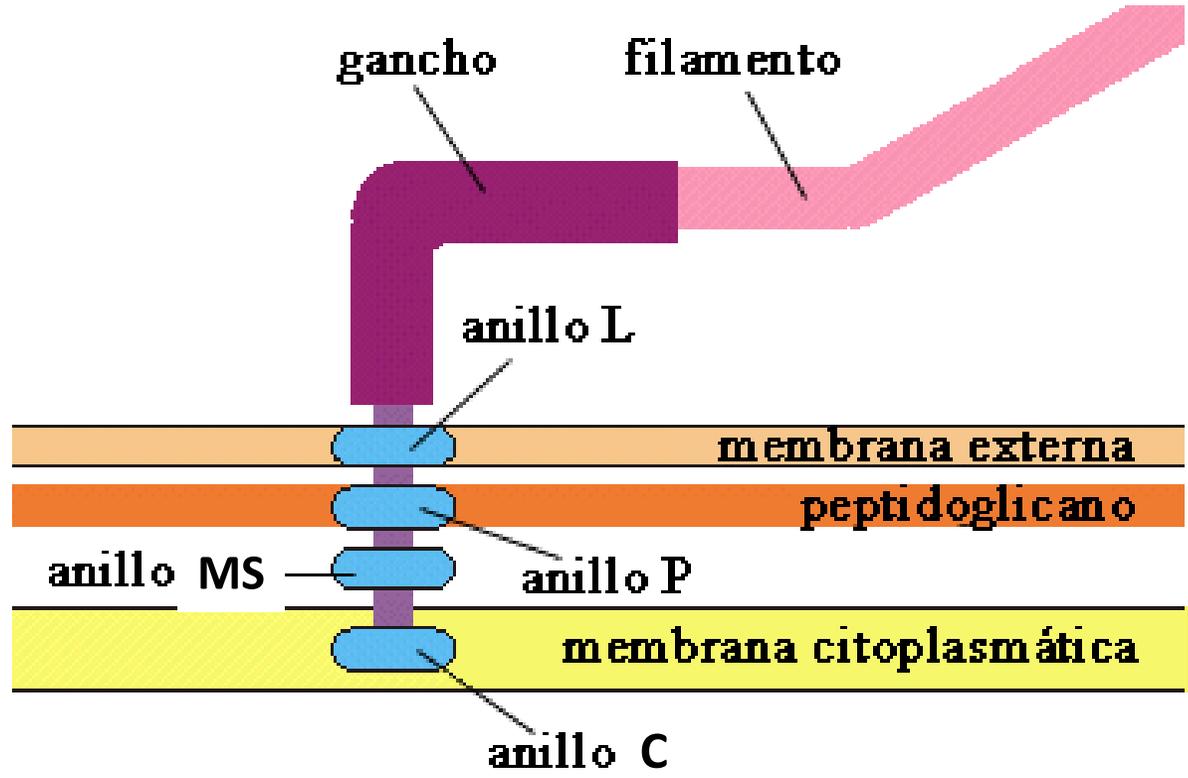
- ❖ La forma de los flagelos no es recta sino helicoidal.
- ❖ El filamento de los flagelos bacterianos se compone de subunidades de la proteína FLAGELINA.
- ❖ Un flagelo consta de varios componentes y se mueve por rotación.
- ❖ La base del flagelo presenta una estructura diferente a la del filamento.



❖ En la base del filamento existe una región más ancha que se llama gancho, que consta de un tipo único de proteína y cuya función es unir el filamento a la parte motora del flagelo.

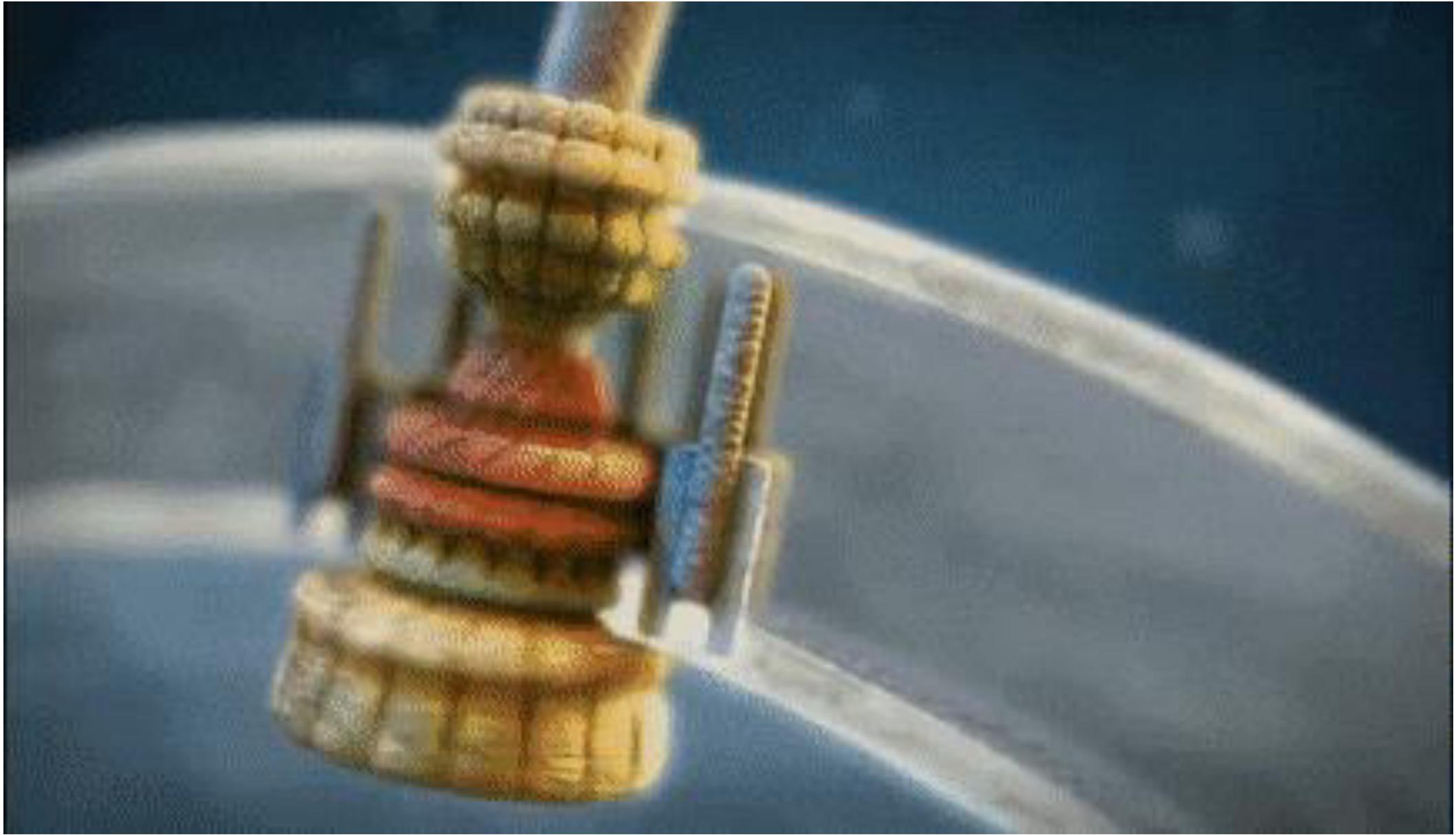
❖ El motor del flagelo se ancla en la membrana citoplasmática y en la pared celular y está constituido por un eje central que atraviesa una serie de anillos.

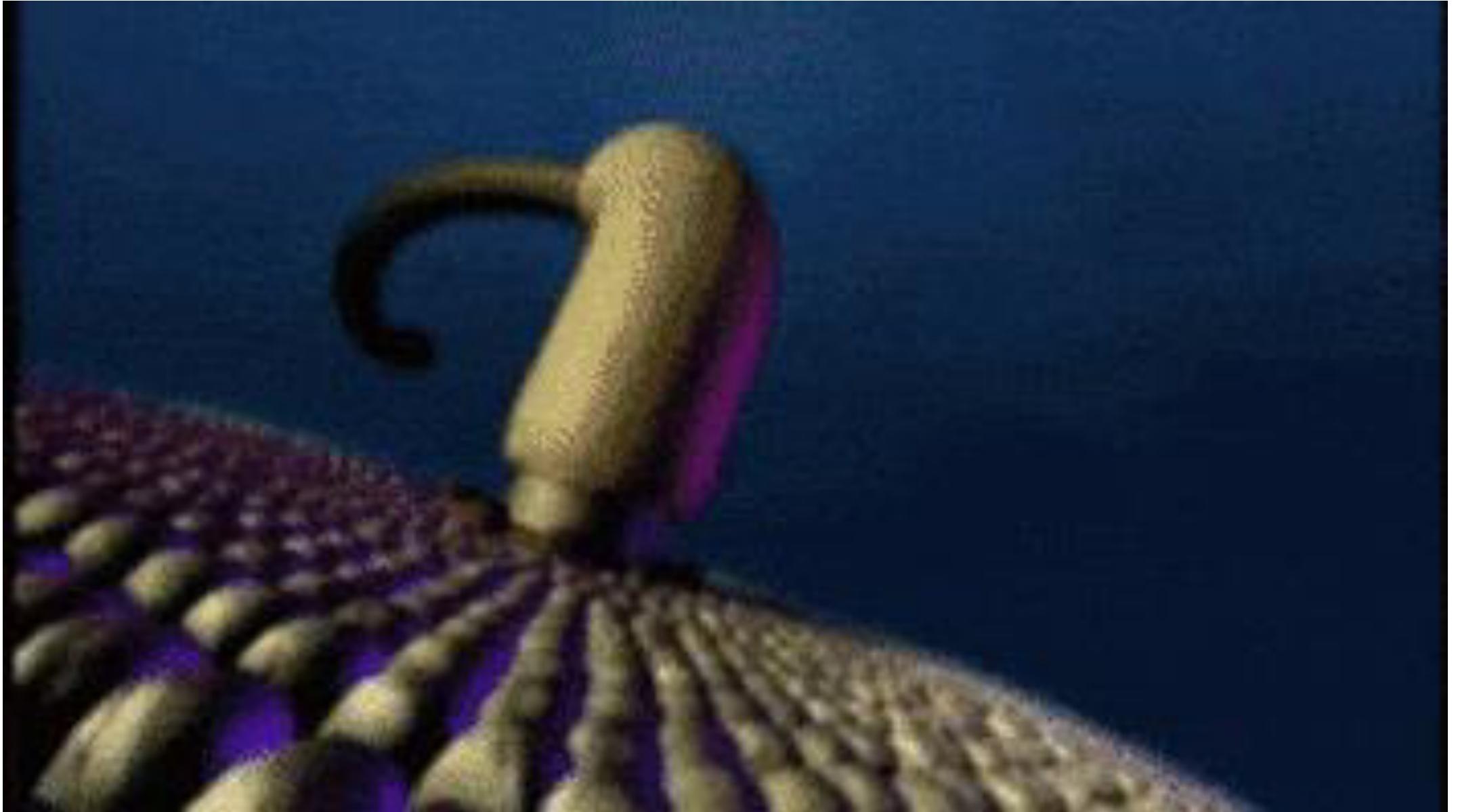




MOVIMIENTO DEL FLAGELO BACTERIANO

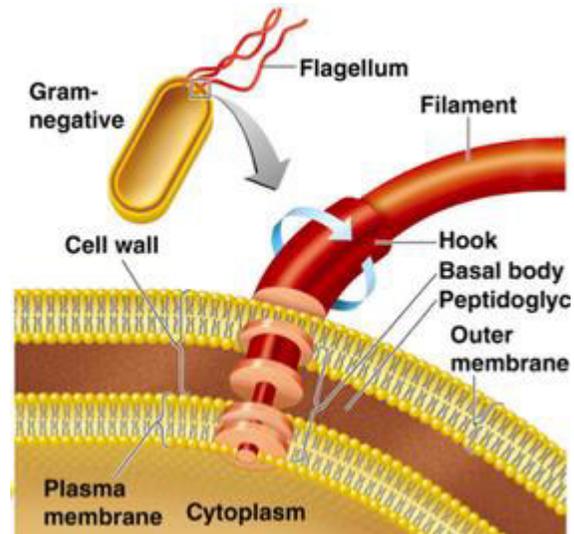
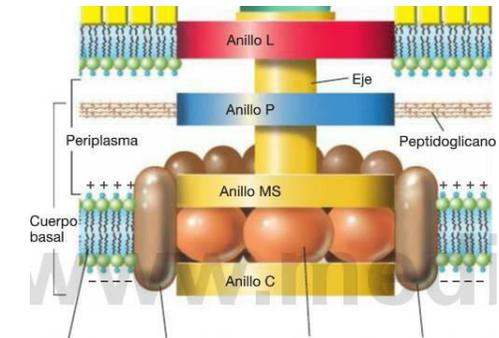






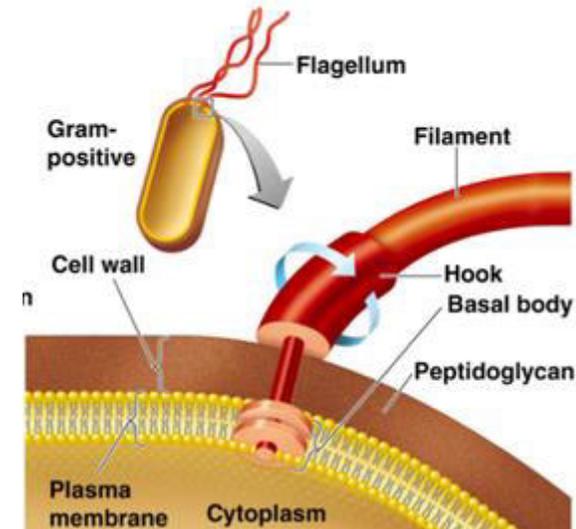
GRAM -

- Tienen un anillo externo que está anclado en la capa de lipopolisacárido (L)
- Otro en la capa de peptidoglicano de la pared celular (P)
- Y una tercera serie de anillos internos (MS y C) que se localizan en la membrana citoplasmática y en el citoplasma, respectivamente.



GRAM +

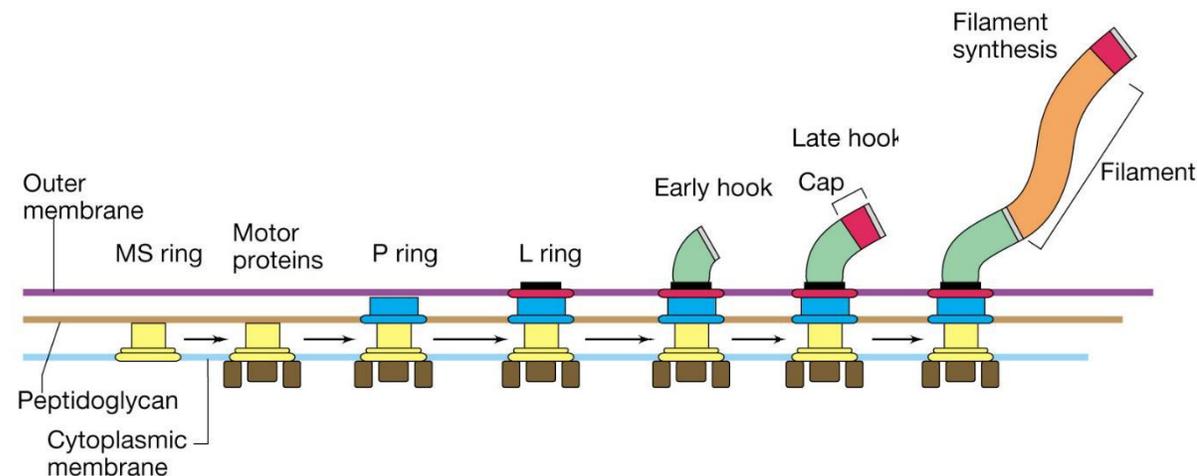
- Carecen de membrana externa, sólo se presenta el par de anillos internos.
- Alrededor del anillo más interno, y ancladas en la membrana citoplasmática están las proteínas Mot.
- Las proteínas Fli, funcionan como un conmutador del motor flagelar, invirtiendo la rotación del flagelo en respuesta a señales intracelulares.



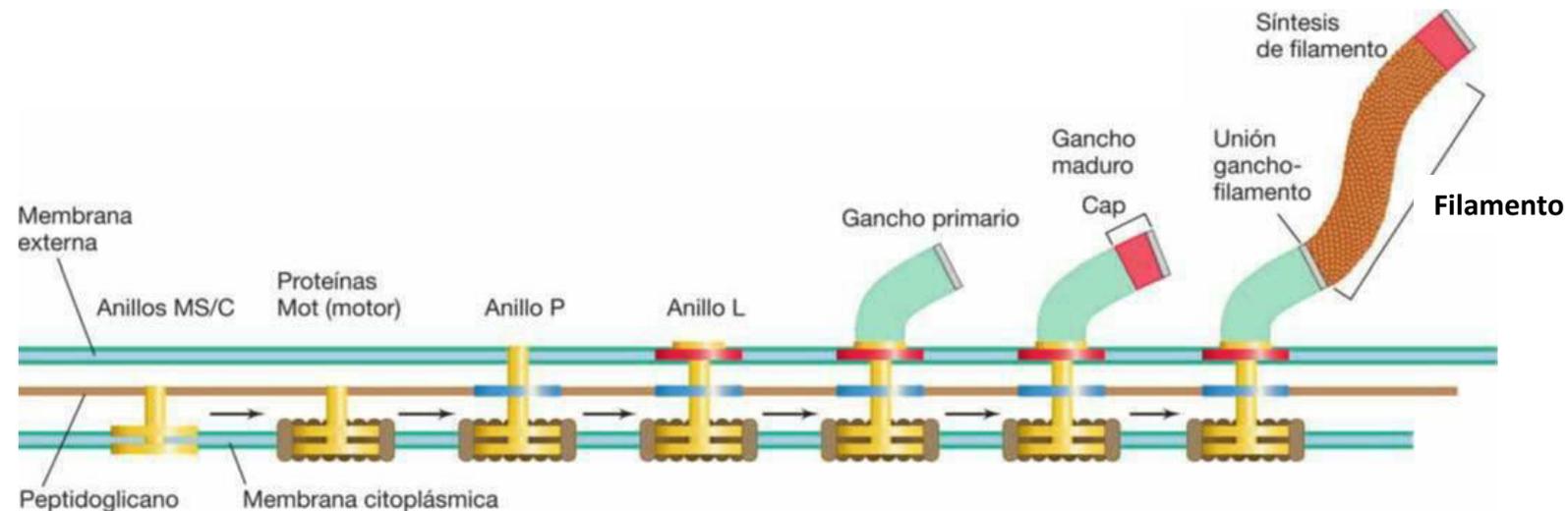
SÍNTESIS DEL FLAGELO



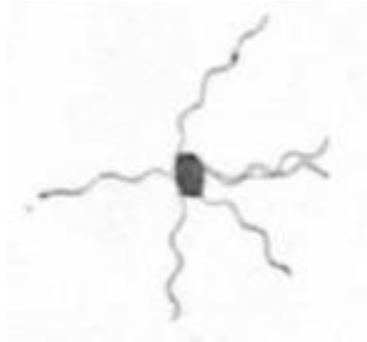
- ❖ Estudios realizados con *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* indican que hay más de 50 genes relacionados con el movimiento.
- ❖ Realizan varias funciones y codifican tanto las proteínas estructurales del aparato flagelar, como la salida de los componentes del flagelo a través de la membrana, y están implicados en la regulación de muchos procesos bioquímicos que tienen lugar durante la síntesis de nuevos flagelos.
- ❖ Un flagelo individual no crece desde su base como lo hace un pelo de un animal, sino que crece por su punta.
- ❖ El anillo C y el MS se sintetizan inicialmente y se insertan en la membrana, luego se sintetizan otras proteínas de anclaje junto con el gancho antes de que se inicie la formación del filamento flagelar.
- ❖ Las moléculas de flagelina se desplazan hasta el gancho para hacer el filamento y se sitúan en su posición correcta



- ❖ Las moléculas de flagelina se sintetizan en el citoplasma y pasan a través de un canal de 3 nm situado en el interior del filamento hasta situarse por aposición en su extremo.
- ❖ En el extremo de un flagelo en crecimiento existe una proteína terminal (cap) que ayuda a las moléculas de proteína que difunden por el canal interior a distribuirse de forma organizada en el extremo terminal para formar la nueva porción de filamento.
- ❖ Para hacer un filamento se necesitan aproximadamente 20.000 moléculas de flagelina.
- ❖ El flagelo crece de modo continuo hasta que alcanza su longitud final.
- ❖ Los flagelos rotos son todavía capaces de rotar y pueden ser reparados por nuevas unidades de flagelina que llegan a través del canal del filamento para reemplazar las unidades proteicas que se han perdido.



DISPOSICIÓN FLAGELAR



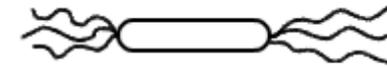
Peritrica
flagelos por todo el cuerpo



Monotrico
un solo flagelo polar



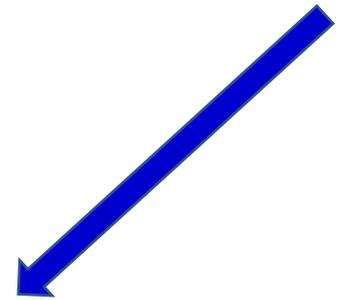
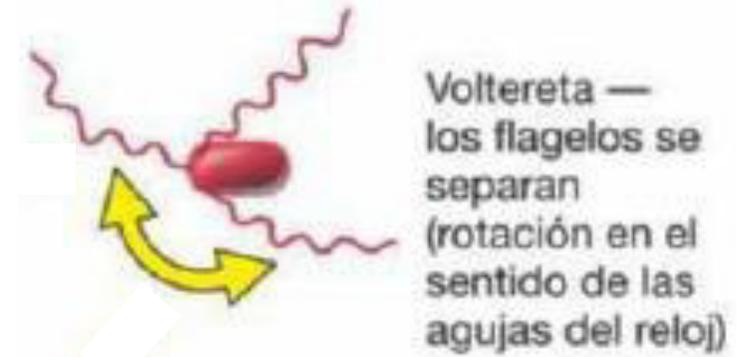
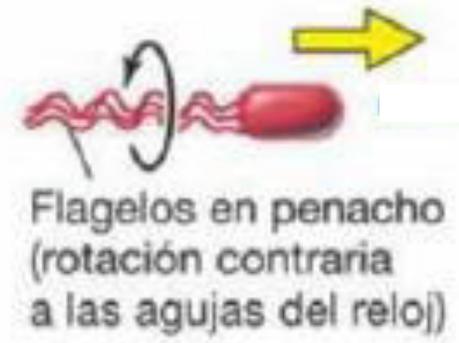
Lofotrica
Penacho de flagelo



Anfitrica
flagelos a ambos extremos

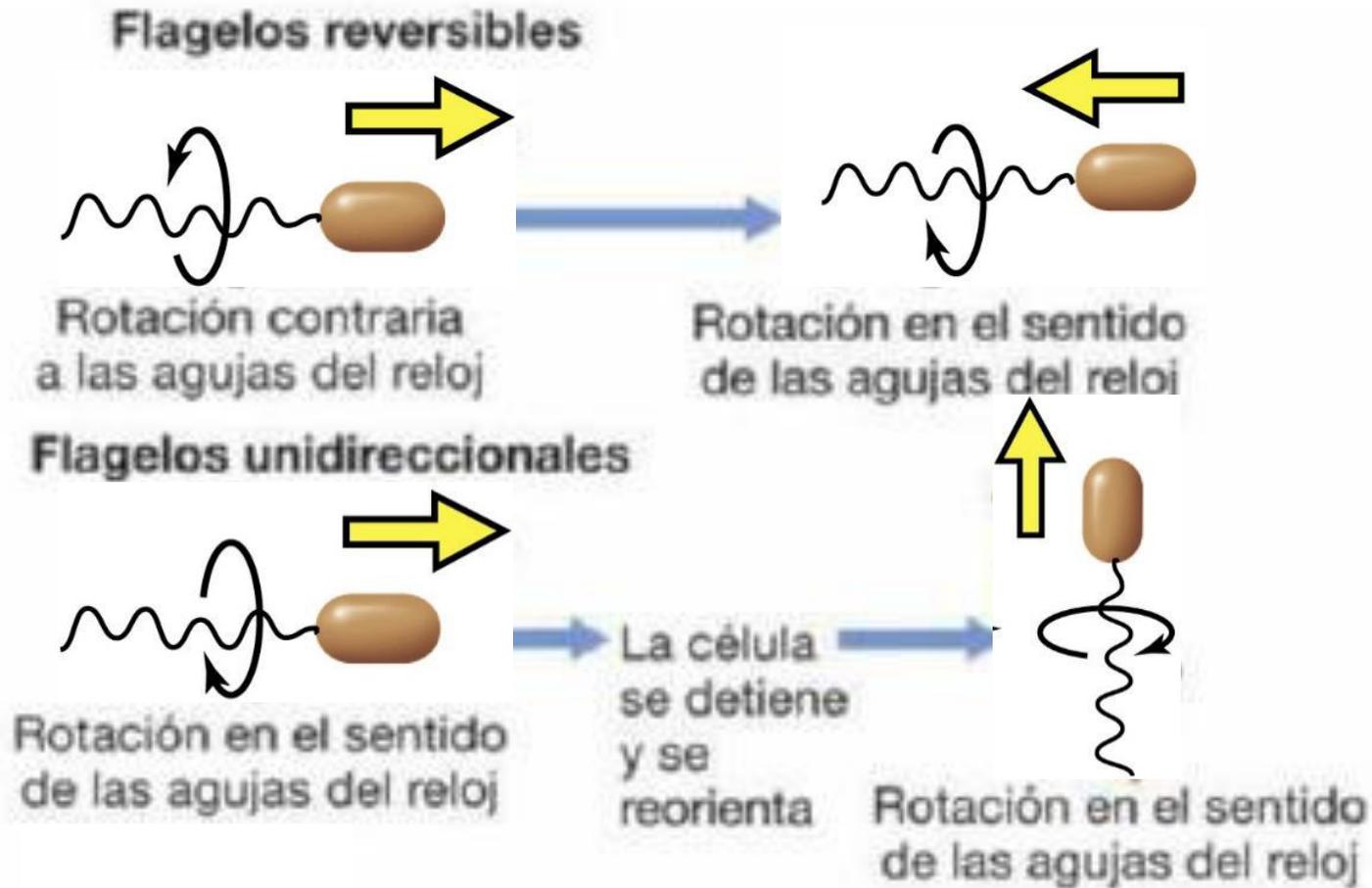
PERITRICA

- ✓ El movimiento hacia delante se debe a la rotación de los flagelos en sentido contrario a las agujas del reloj.
- ✓ La rotación en el sentido de las agujas del reloj origina una voltereta.
- ✓ Luego, cuando vuelve a producirse una nueva rotación contraria a las agujas del reloj, la célula se desplaza en una nueva dirección.



POLAR

- ✓ Las células cambian de sentido invirtiendo la rotación flagelar o bien, en el caso de flagelos unidireccionales, mediante paradas periódicas que permiten la reorientación y luego el movimiento hacia delante.



FLAGELOS DE ARQUEAS



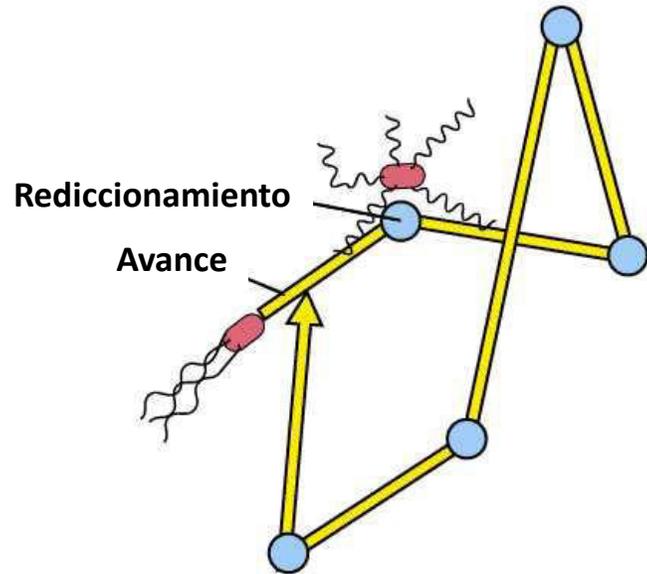
- ❖ Más finos que los bacterianos (10 - 12 nm de grosor).
- ❖ Rotan como en *Bacteria*, pero la estructura de su motor flagelar NO se conoce todavía.
- ❖ Los componentes de la pared celular que tienen un importante papel en el anclaje del flagelo en las bacterias gram - NO existen en arqueas, y por tanto existen diferencias estructurales.
- ❖ En *Archaea* existen varias flagelinas diferentes (en *Bacteria* solo una).
- ❖ El movimiento de las células de *Halobacterium* muestran que la velocidad del desplazamiento es 1/10 de la de *Escherichia coli*.
- ❖ Se desconoce si esto es una característica generalizada en arqueas, pero el diámetro menor de los filamentos presentes en este dominio en comparación con el flagelo bacteriano probablemente reduciría naturalmente el par de torsión y la potencia del motor flagelar, de tal modo que las velocidades más lentas no resultan sorprendentes.



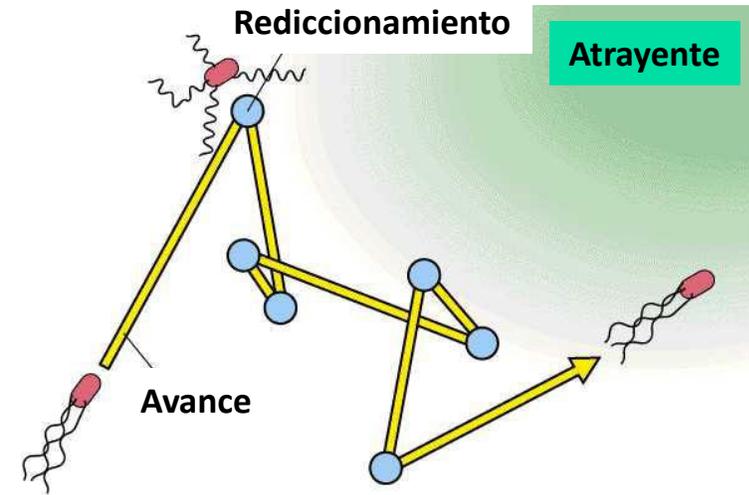
Flagelos aislados de *Methanococcus maripaludis*. Grosor de 12 nm.

MOVIMIENTOS DE PROCARIOTAS

Ausencia de atrayente químico



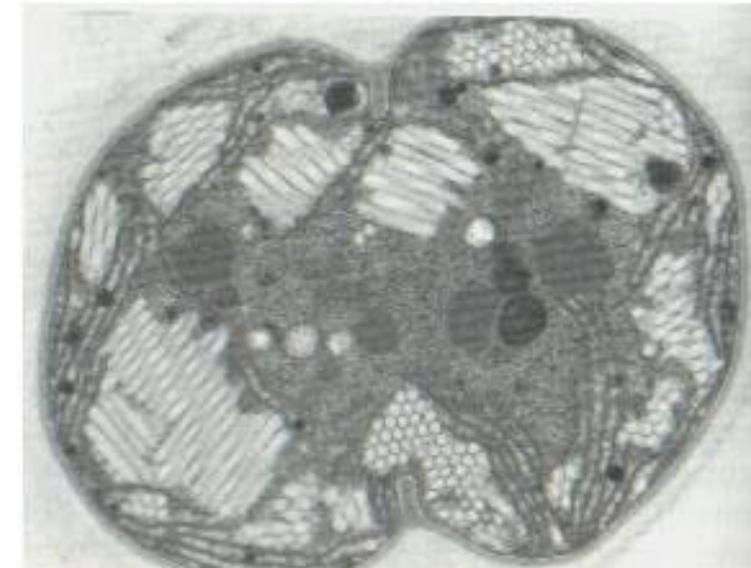
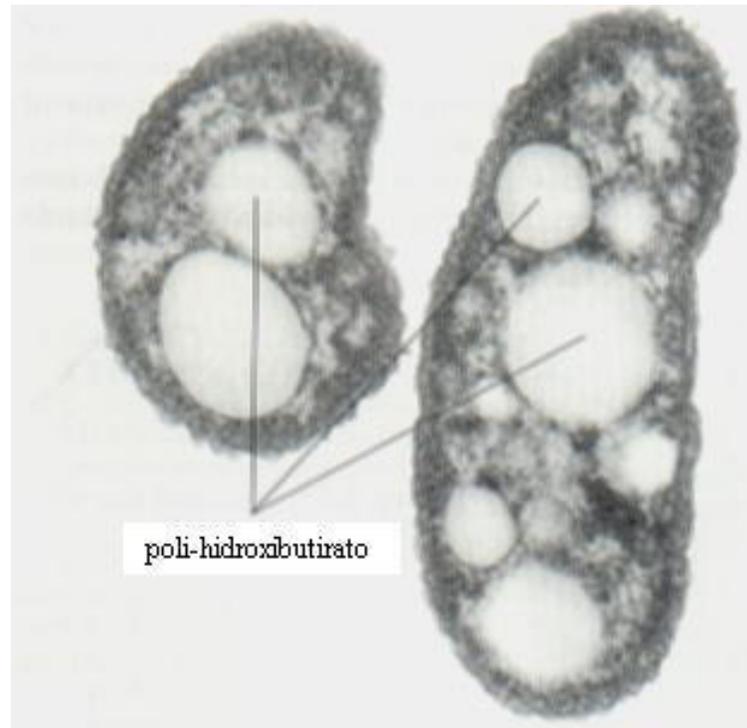
Presencia de atrayente químico



INCLUSIONES CITOPLASMÁTICAS

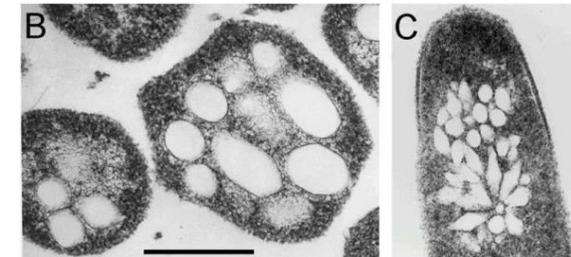
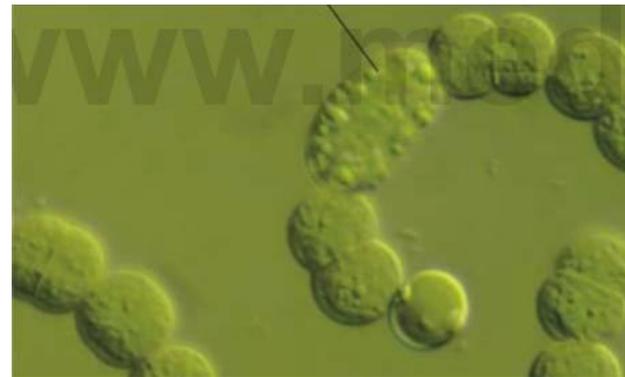
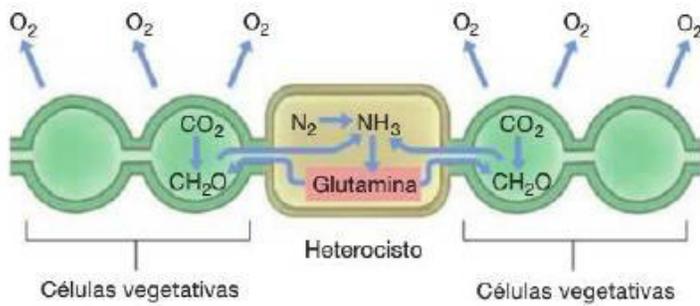
Algunos procariontas tienen estructuras internas

- ❖ Gránulos de almacenamiento - polifosfato, sulfuro, polihidroxibutirato (PHBs)
- ❖ Vesículas de gas - flotación
- ❖ Membranas fotosintética y respiratoria



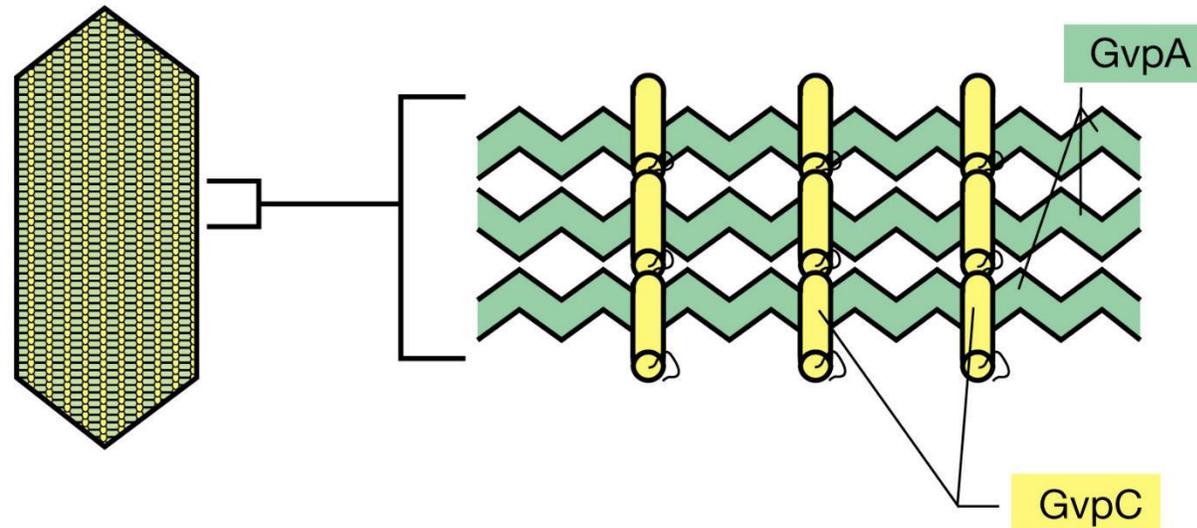


- ❖ Algunos procariontes son planctónicos, viven flotando en las columnas de agua de los lagos y los océanos porque poseen vesículas de gas.
- ❖ Son estructuras huecas (nanocompartimentos), fusiformes llenas de gas y formadas por proteínas, rígidas.
- ❖ Son de longitud y diámetro variable (300-1.000 y 45-120 nm respectivamente).
- ❖ Les confieren flotabilidad, permitiendo que se posicionen en las columnas de agua a diferentes alturas en función de las condiciones ambientales.
- ❖ Los ejemplos más llamativos son las cianobacterias, que forman acumulaciones masivas en los lagos y otros ambientes acuáticos.
- ❖ Estas células suben a la superficie y son arrastradas por los vientos en grandes masas.



- ❖ Varias bacterias fotótrofas rojas y verdes poseen también vesículas gaseosas, así como algunas bacterias no fotótrofas que viven en lagos y estanques.
- ❖ Presentes en algunas arqueas y ausentes en eucariotas.

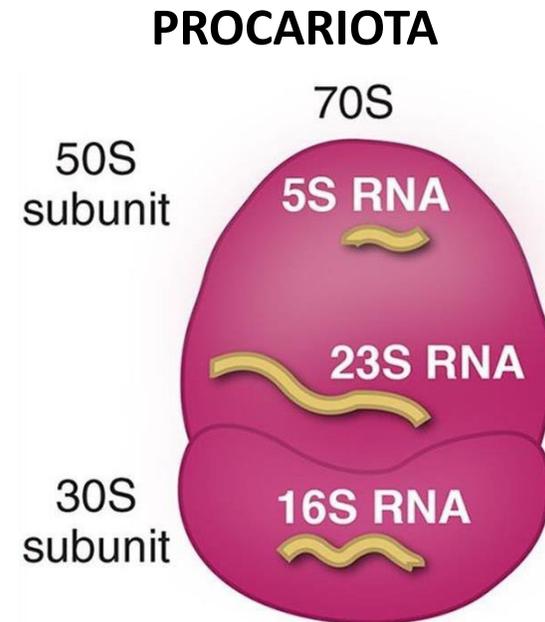
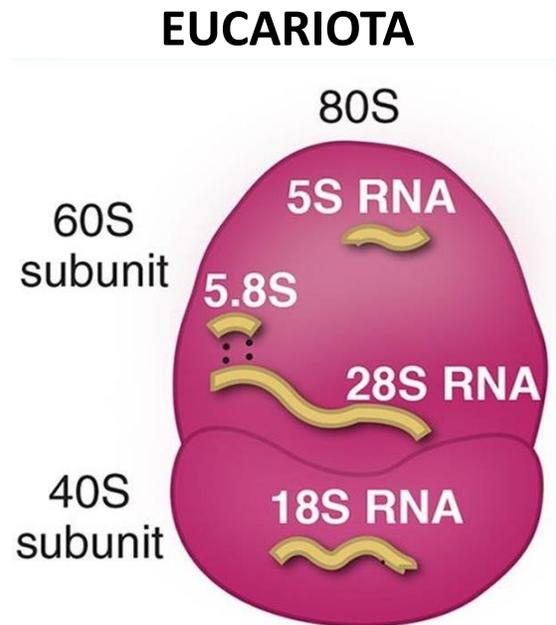
PROTEÍNAS DE LAS VESÍCULAS DE GAS



Estructura hermética permeable a los gases (proteínas hidrofóbicas)

RIBOSOMAS

Estructuras de la célula compuestas por ARN y proteínas donde se sintetizan las proteínas.



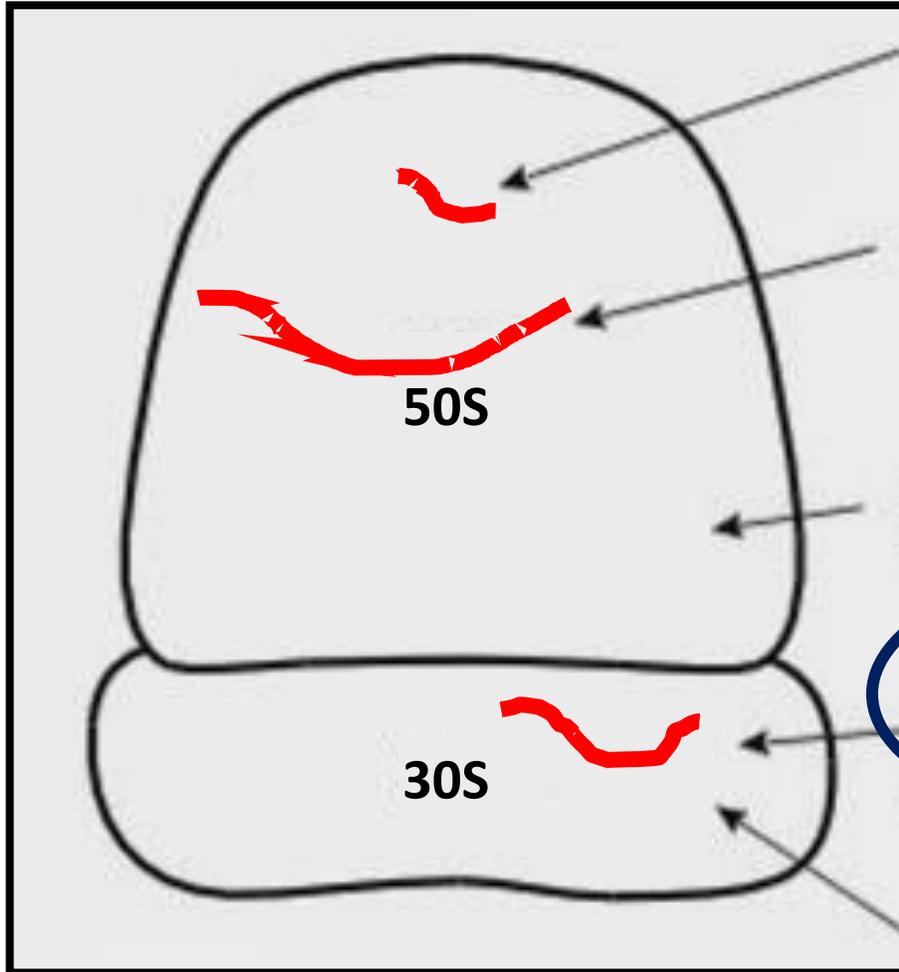
Interaccionan con proteínas del citoplasma y con los ARNm y de transferencia en el proceso esencial de la **SÍNTESIS PROTEICA** (traducción)

RIBOSOMAS → ARNr + proteínas ribosomales

Svedverg: Coef. de sedimentación

vel cte sed (m/s) / aceleración aplicada (m/s²)

RIBOSOMA PROCARIOTA 70S



ARNr 5S

(120 nucleótidos de longitud)

ARNr 23S

(2.904 nucleótidos de longitud)

~35 proteínas

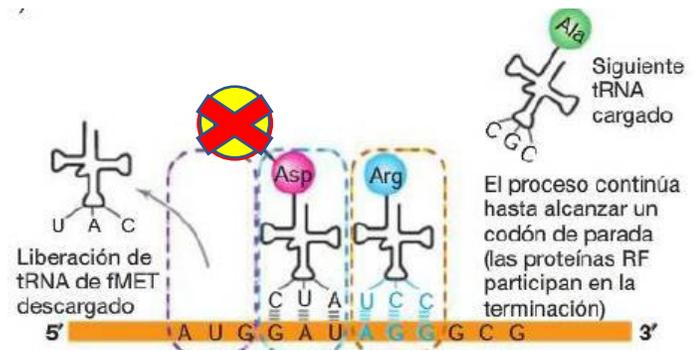
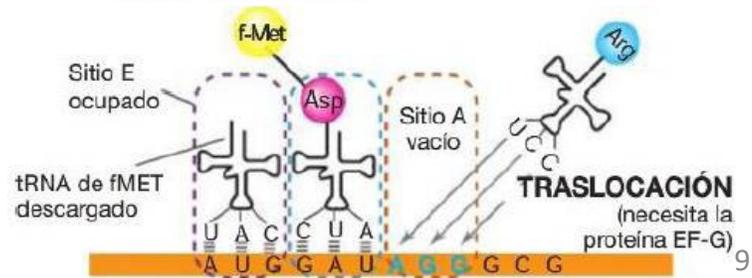
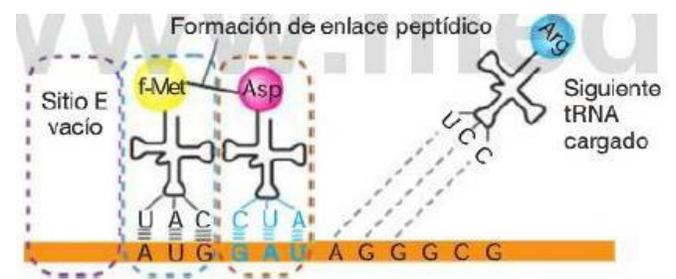
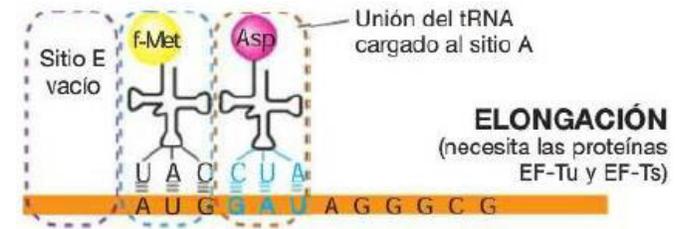
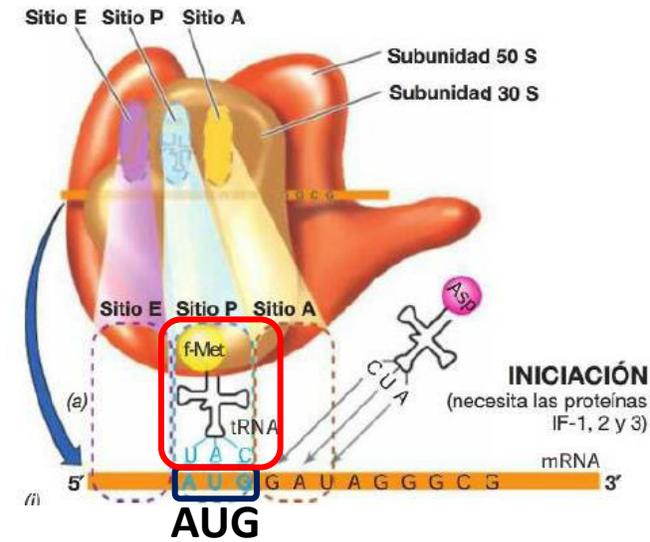
ARNr 16S

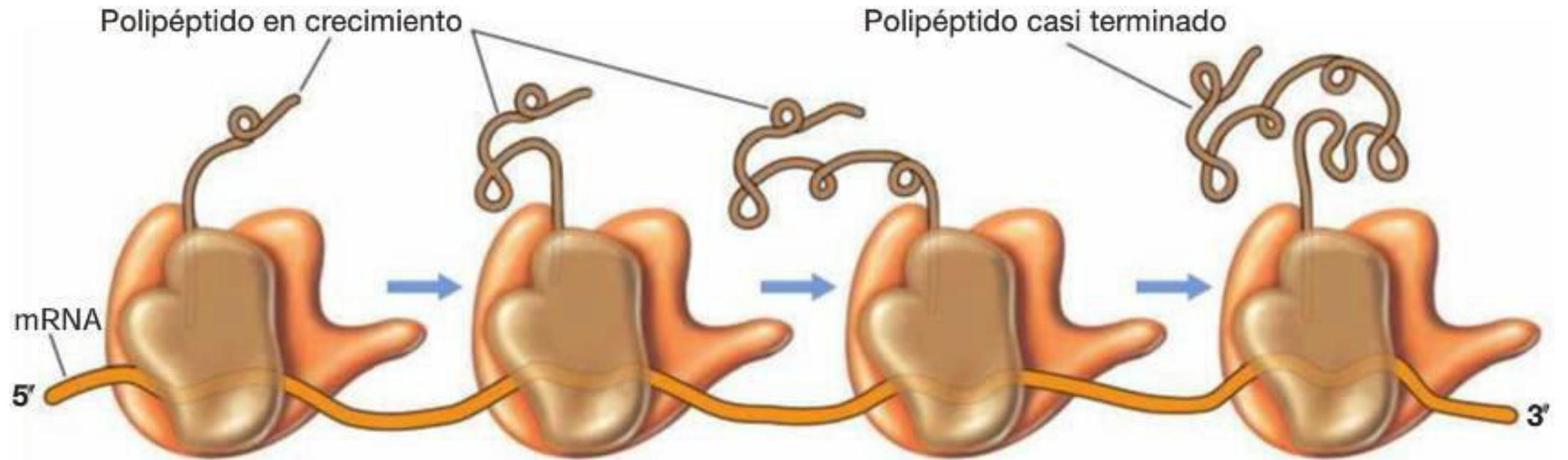
(1.542 nucleótidos de longitud)

~21 proteínas

Filogenia y taxonomía bacteriana

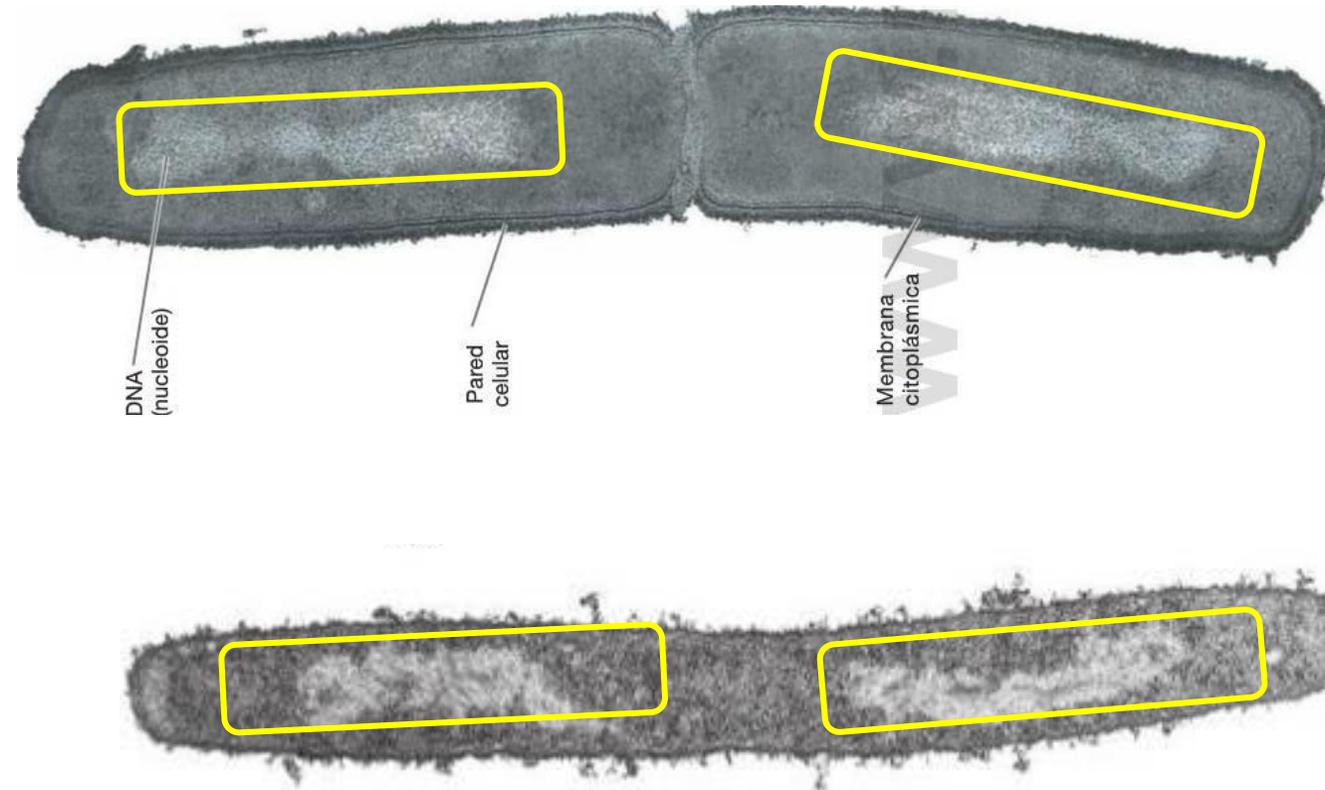
- ❖ El inicio de la traducción siempre se produce con la unión de un aminoacil-tRNA iniciador especial al codón de inicio, AUG.
- ❖ En las bacterias, es SIEMPRE el formilmetionil-ARNt.
- ❖ Cuando el polipéptido está terminado, el grupo formilo SE ELIMINA.
- ❖ En consecuencia, el aminoácido N-terminal de la proteína completa será metionina.
- ❖ Sin embargo, en muchas proteínas esta metionina es eliminada por una proteasa específica.





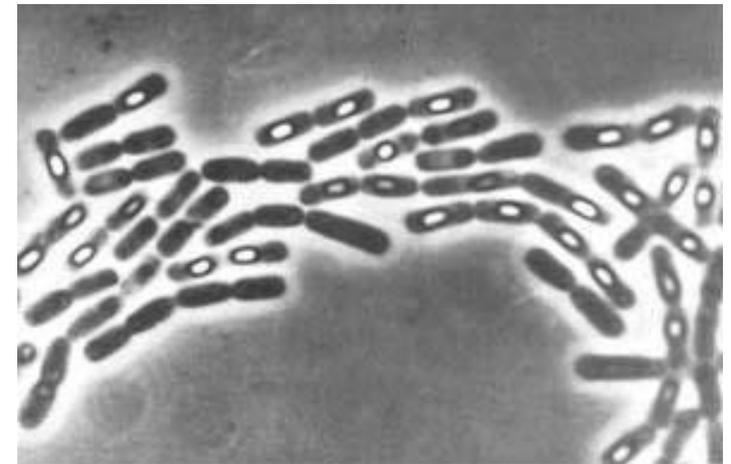
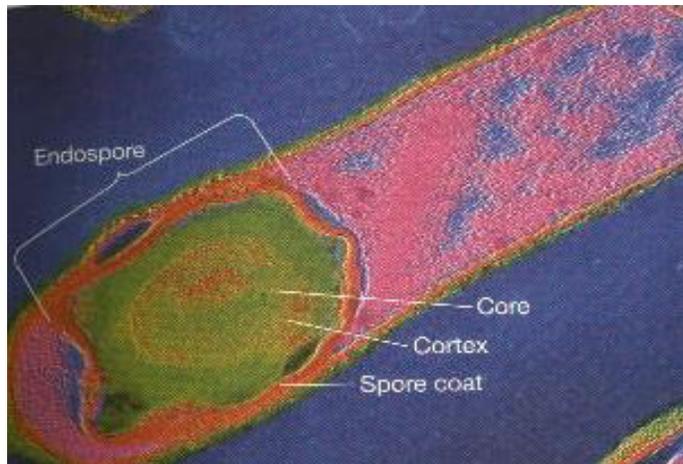
NUCLEOIDE

Masa visible que contiene al ADN en los procarióticas



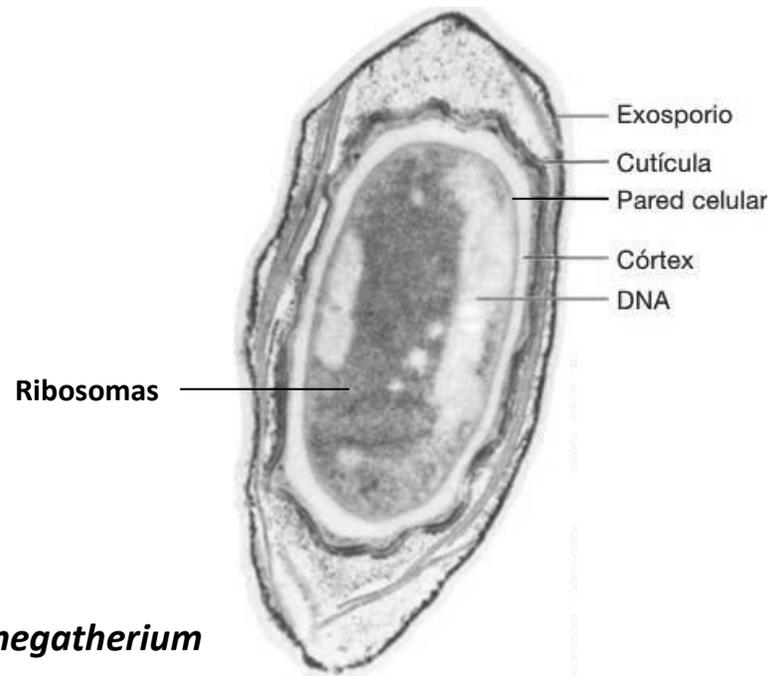
ENDOSPORA

- ❖ Estructuras intracelulares producidas por algunas bacterias.
- ❖ Se encuentran habitualmente en el suelo y los géneros mejor estudiados son *Bacillus* y *Clostridium*.
- ❖ Mediante un proceso denominado ESPORULACIÓN reducen el citoplasma por deshidratación y se recubren de una cubierta gruesa, quedando en estado de latencia.
- ❖ Las endosporas protegen el ADN con ácido dipicolínico (DPA) y proteínas.
- ❖ Se produce en respuesta a condiciones adversas (T° extremas, agentes químicos, desecación, limitación de nutrientes), posibilitando que el organismo resista dichas condiciones.
- ❖ Después de muchos años o décadas, germinará en condiciones favorables dando lugar a una nueva bacteria (forma vegetativa).



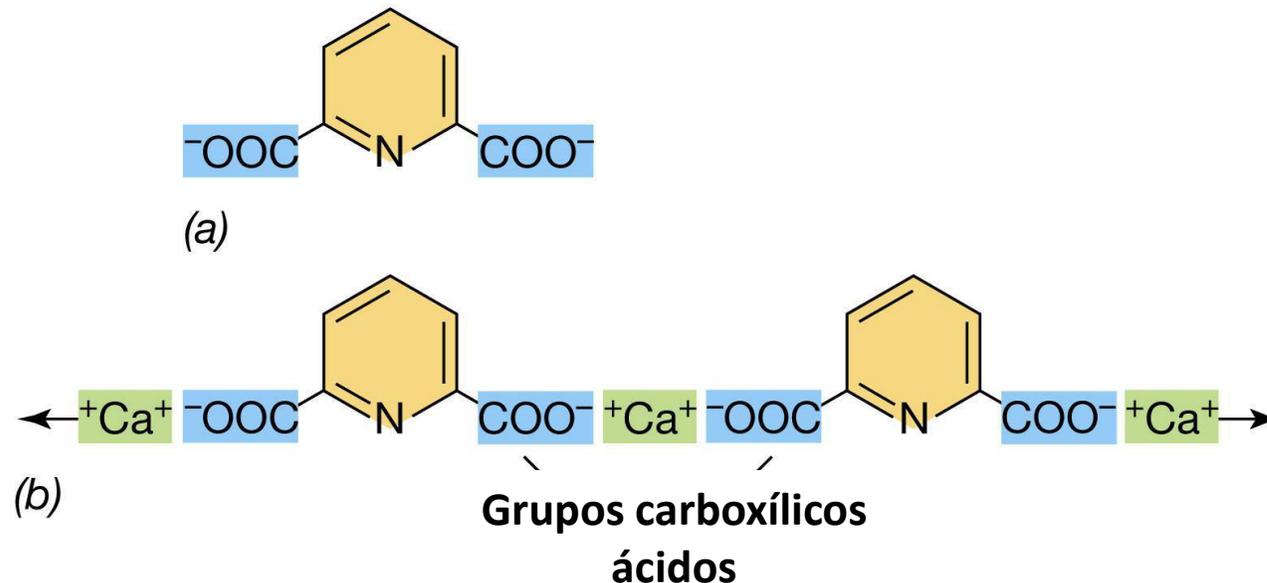
ESTRUCTURA DE LA ENDOSPORA

- ❖ Son impermeables a la mayoría de los colorantes (se observan como regiones no teñidas dentro de las células teñidas).
- ❖ Para teñirlas se debe usar verde malaquita caliente.
- ❖ Presenta muchas capas que están ausentes en la célula vegetativa.
- ❖ La capa más externa es el EXOSPORIO (proteína).
- ❖ Por debajo la CUTÍCULA o cubierta de la spora (proteínas específicas).
- ❖ Por debajo el CÓRTEX (capa de peptidoglicano con uniones laxas).
- ❖ Sigue el núcleo, que contiene la pared, la membrana citoplasmática, el citoplasma, el nucleoide, los ribosomas y otros orgánulos celulares esenciales.



Bacillus megatherium

- ❖ La endospora se diferencia estructuralmente de la célula vegetativa en el tipo de estructuras situadas fuera de la pared del núcleo de la espora.
- ❖ Un compuesto químico característico de las endosporas, y ausente en las células vegetativas, es el ácido DIPICOLÍNICO que se localiza en el núcleo.
- ❖ Las endosporas son ricas en iones Ca^{2+} , que en gran parte se combinan con el ácido dipicolínico que forman un complejo que reduce la disponibilidad de agua dentro de las endosporas, favoreciendo su deshidratación y suponen alrededor del 10% del peso seco de la endospora.
- ❖ Los complejos se intercalan en el ADN, insertándose entre las bases, estabilizando de este modo el ADN frente a la desnaturalización por el calor.



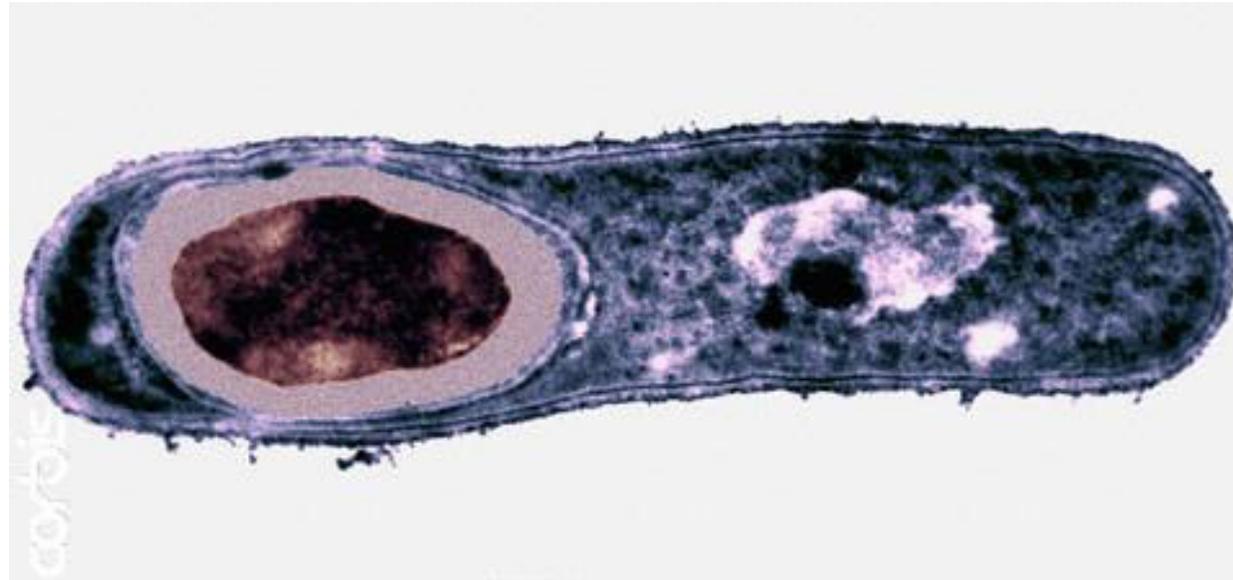
DIFERENCIAS ENTRE ENDOSPORAS Y CÉLULAS VEGETATIVAS



CARACTERÍSTICA	CÉLULA VEGETATIVA	ENDOSPORA
Apariencia microscópica	No refractaria	Refractaria
Contenido de Ca	Bajo	Alto
ADP	-	Alto
Actividad enzimática	Alta	Baja
Metabolismo (Toma de O ₂)	Presente	Bajo o ausente
Síntesis macromolecular	Presente	Ausente
ARNm	Presente	Bajo o ausente
Resistencia al calor	Baja	Alta
Resistencia a la radiación	Baja	Alta
Resistencia a químicos y ácidos	Baja	Alta
Capacidad de tinción	Si	Solo con métodos especiales
Acción de lisozimas	Sensible	Resistente
Contenido de agua	80-90%	10-25%
Proteínas solubles en ácido	Ausentes	Presentes
pH citoplasmático	~7	5,5 - 5,0

FORMACIÓN DE ENDOSPORAS

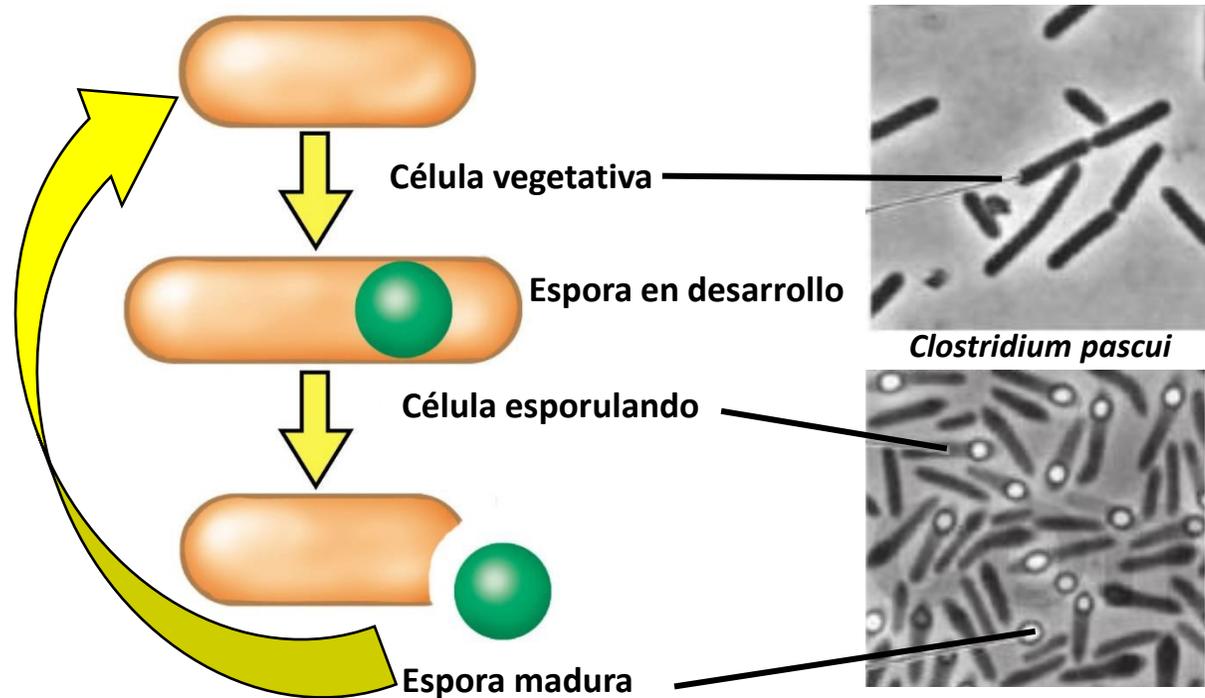
- ❖ Durante la formación de la endospora, una célula vegetativa se convierte en una estructura inerte y termorresistente.
- ❖ La espora se forma dentro de la célula vegetativa (endospora).
- ❖ Las células NO esporulan cuando están en crecimiento sino cuando cesa el crecimiento debido a la desaparición de un nutriente esencial (*Bacillus* cesa el crecimiento vegetativo y comienzan la esporulación cuando un nutriente carbonado o nitrogenado llega a ser un factor limitante).
- ❖ Una bacteria es capaz de permanecer en estado latente durante muchos años y después dar lugar a una célula vegetativa de un modo relativamente rápido.



FORMACIÓN DE ENDOSPORAS Y GERMINACIÓN



- ❖ El proceso ocurre en 3 pasos: **ACTIVACIÓN, GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO.**
- ❖ Las endosporas se originan dentro de la célula vegetativa y representan el estado durmiente de un ciclo de vida bacteriano del tipo:
célula vegetativa → endospora → célula vegetativa, liberándose por lisis celular.
- ❖ Al final de la esporulación, la célula madre se autolisa, y la espora queda libre.



- Resistente al calor, radiación, ácidos, desecado, productos químicos.
- No contienen ARN
- Deshidratada (solo 10-30% H₂O)

CONTROL DE LA FORMACIÓN DE ENDOSPORAS

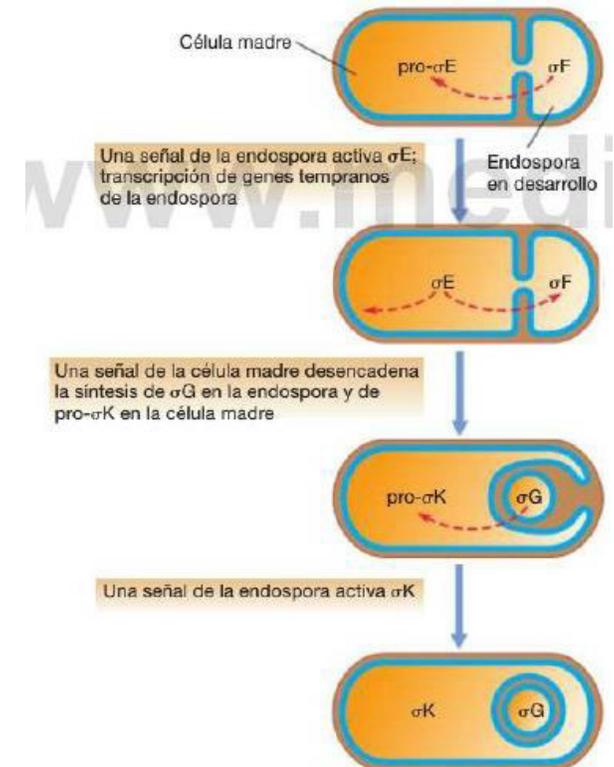
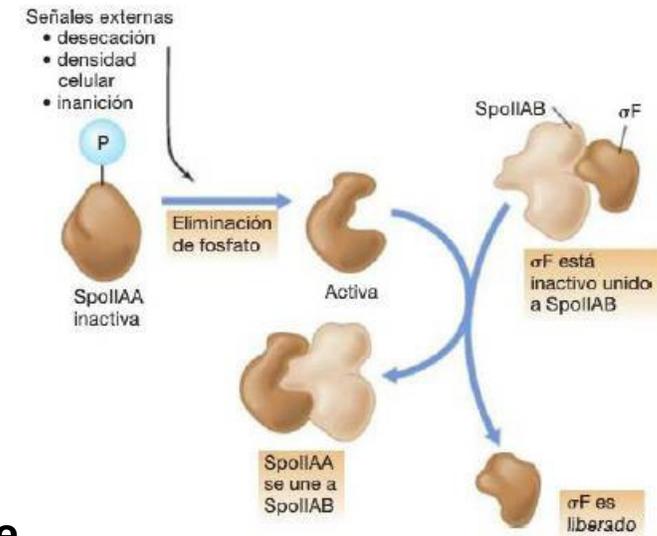
Bacillus

Una vez iniciado, está controlado por 4 factores sigma diferentes, 2 de los cuales (σF y σG) activan los genes necesarios en la propia endospora en desarrollo, y otros 2 (σE y σK) activan los genes necesarios para la célula madre que envuelve la endospora.

Cuando se recibe una señal externa determinada, una cascada de factores sigma controla la diferenciación:

- La SpollAA activa se une al factor antisigma SpollAB, y libera el primer factor sigma, σF .
- El factor σF inicia una cascada de factores sigma, algunos de los cuales ya existen y necesitan ser activados, y otros no están aún presentes y tienen que ser expresados.

Después, estos factores sigma promueven la transcripción de los genes necesarios para el desarrollo de la endospora.



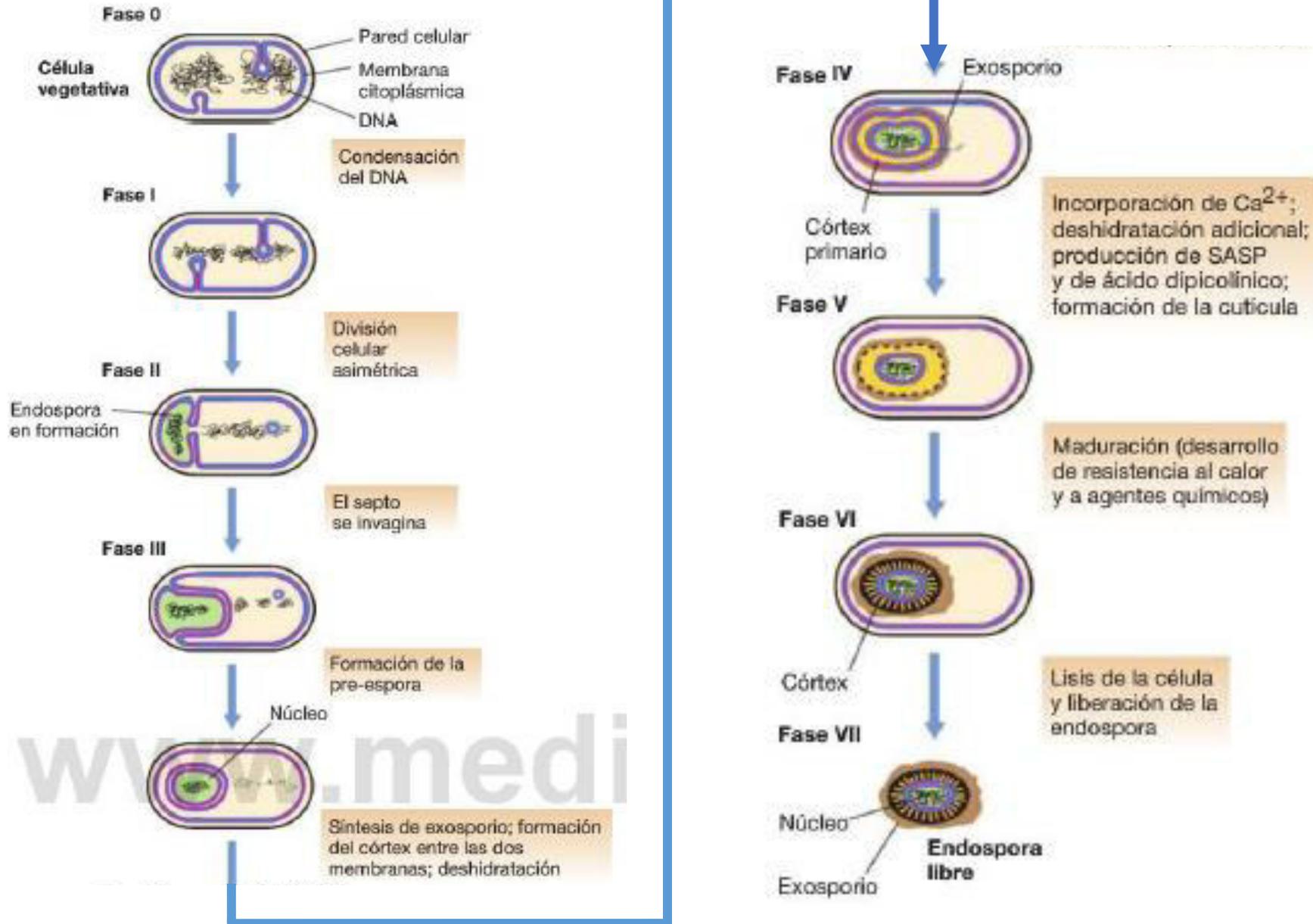


- ❖ La señal de esporulación, transmitida a través de SpoOA, activa a σF en la célula más pequeña, destinada a convertirse en endospora.
- ❖ σF ya está presente, pero se encuentra inactiva, al estar unida a un factor antisigma.
- ❖ La señal de SpoOA activa una proteína que se une al factor antisigma, lo inactiva y libera la σF .
- ❖ Una vez libre, σF se une a la ARN-polimerasa y permite la transcripción (en el interior de la espora) de los genes cuyos productos serán necesarios en la siguiente etapa de la esporulación.
- ❖ Entre ellos se encuentra el gen del factor sigma σG y los genes para las proteínas que entran a la célula madre y activan el factor σE .
- ❖ Este factor σE es necesario para la transcripción en el interior de la célula madre de más genes, incluido el gen del factor σK .
- ❖ Los factores σG (en la endospora) y σK (en la célula madre) son necesarios para la transcripción de genes necesarios incluso más adelante en el proceso de esporulación.

- ❖ Un aspecto fascinante de la formación de endosporas es que está precedida por lo que es en realidad **CANIBALISMO CELULAR**.
- ❖ Aquellas células en las que SpoOA ya ha sido activada secretan una proteína que lisa células vecinas de la misma especie cuya proteína SpoOA no está aún activa.
- ❖ Esta proteína tóxica va acompañada por una 2da proteína que retrasa la esporulación de las células vecinas.
- ❖ Las células destinadas a la esporulación también sintetizan una proteína antitoxina para protegerse de los efectos de su propia toxina.
- ❖ Las células hermanas sacrificadas son utilizadas como fuente de nutrientes por las endosporas en desarrollo.
- ❖ De hecho, la disminución de determinados nutrientes, como el fosfato, aumenta la expresión del gen que codifica la toxina.



Fases en la formación de la endospora



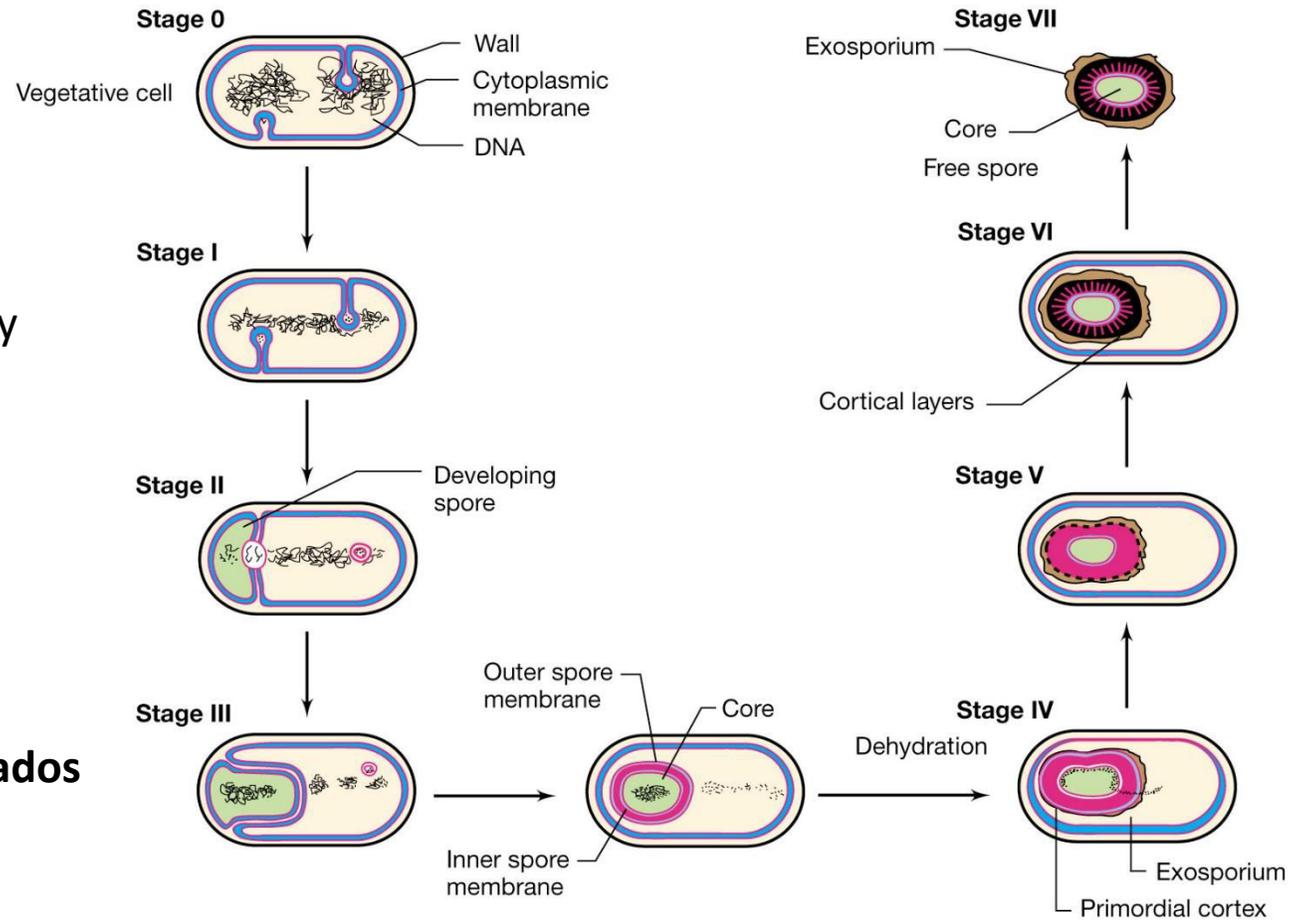
ESPORULACIÓN

Initiated when nutrients limiting

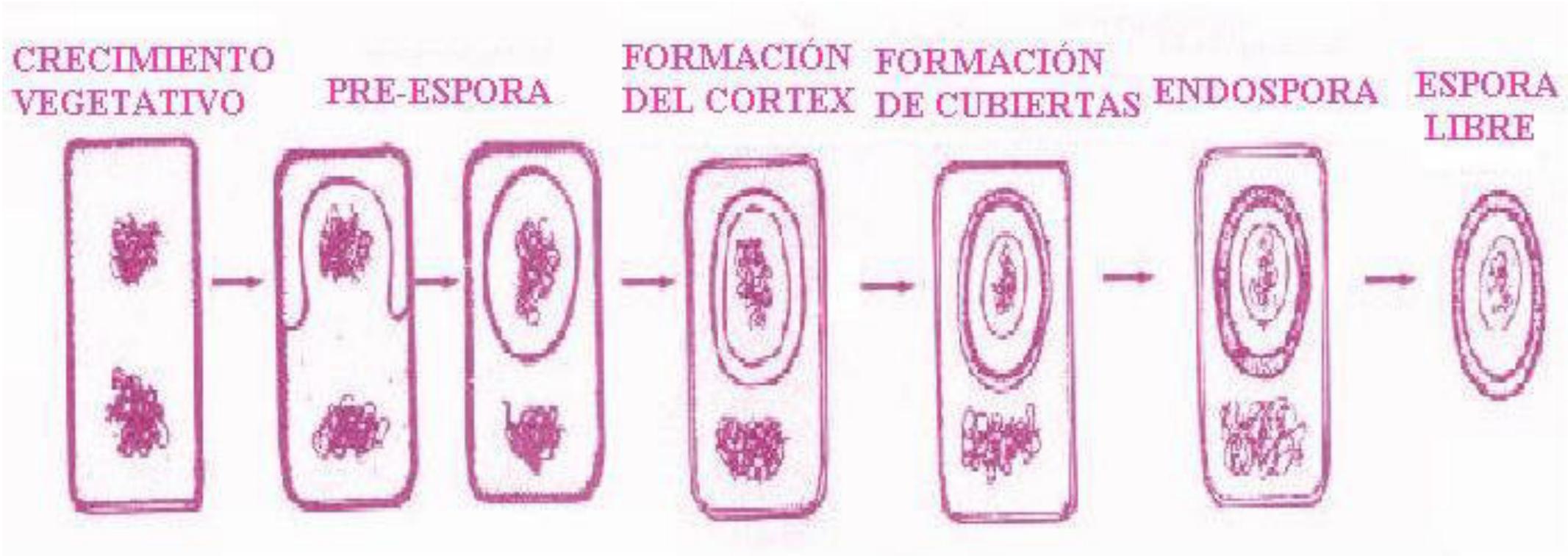
Stages determined by mutational analysis

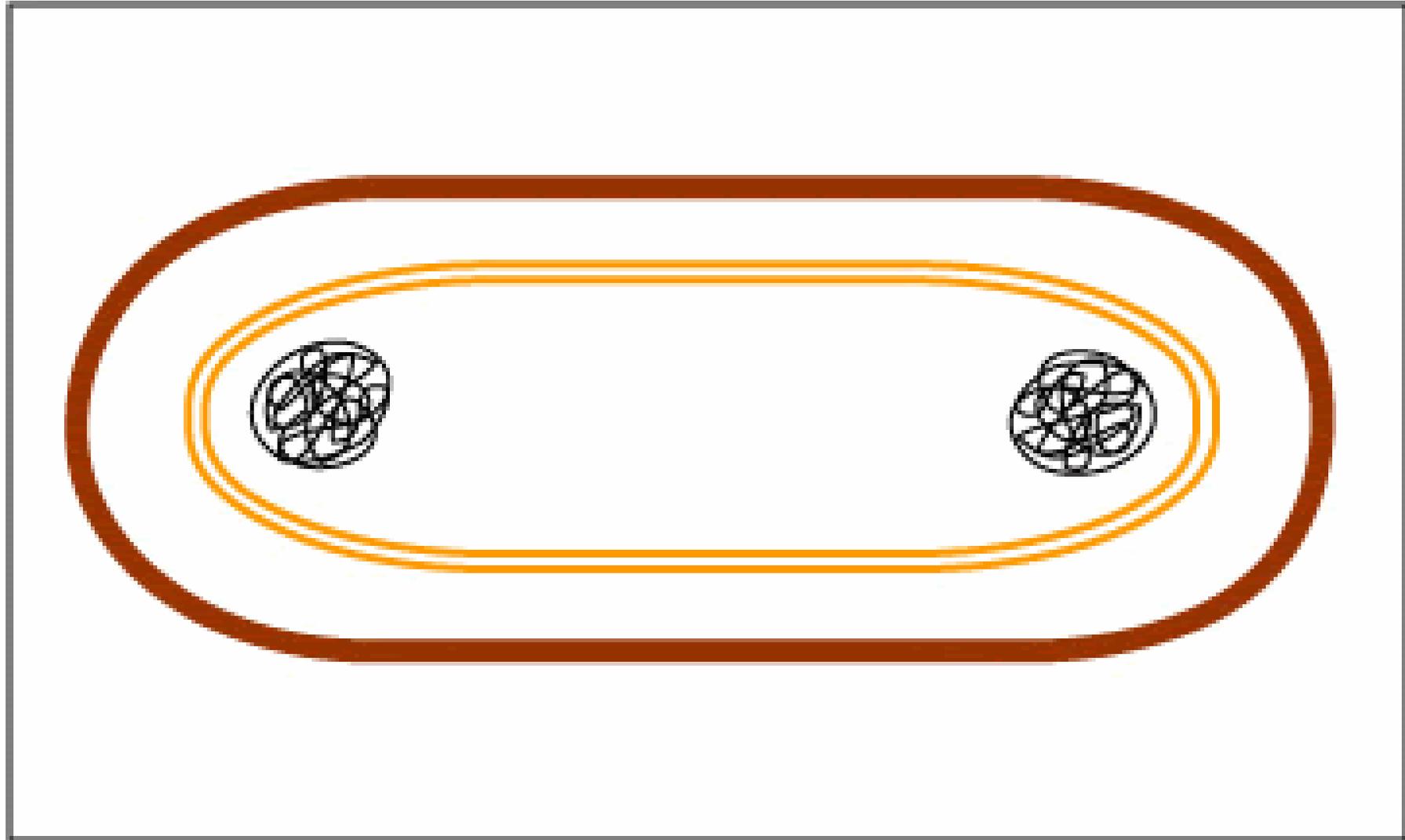
~200 genes involucrados

8 h para el proceso completo



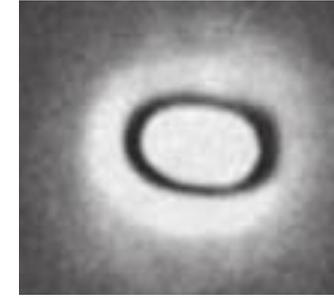
SASP = small acid-soluble spore proteins
 Cortex is composed of peptidoglycan
 Exosporium is a thin protein covering





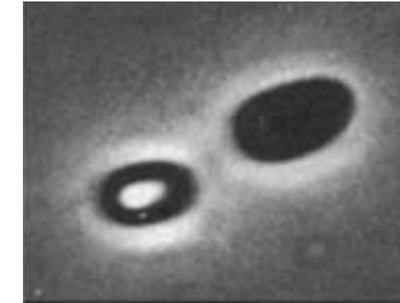
ACTIVACIÓN

Se logra por calentamiento de las endosporas recién formadas, a una temperatura subletal pero elevada.



GERMINACIÓN

Las endosporas activadas germinan cuando se colocan en presencia de nutrientes adecuados (alanina). Es un proceso rápido (minutos) y supone la pérdida de refringencia de la espora, un aumento en la capacidad de tinción por colorantes, y la pérdida de resistencia al calor y a compuestos químicos.



CRECIMIENTO

Hinchamiento visible de la célula debido a la acumulación de agua y a la síntesis de ARN, proteínas y ADN. La célula emerge una vez rota la cubierta de la endospora y comienza a crecer, manteniendo el estado vegetativo hasta que nuevamente detecta señales ambientales que ponen en marcha la esporulación.



Judith Hoeniger y C. L. Headley



Judith Hoeniger y C. L. Headley



GERMINACIÓN DE LA ENDOSPORA



- ❖ Proceso por el cual una espora se convierte al estado vegetativo.
- ❖ Es mucho más rápida que la esporulación (≈ 90 min).

4 etapas:

- i. **PREACTIVACIÓN**
- ii. **ACTIVACIÓN**
- iii. **INICIACIÓN** (o germinación en sentido estricto)
- iv. **CRECIMIENTO ULTERIOR** (entrada en fase vegetativa)

i. **PREACTIVACIÓN**

Antes de que la espora esté en condiciones de germinar se requiere que sus cubiertas se alteren.

En la naturaleza esto ocurre por erosión por envejecimiento progresivo.

Artificialmente, en laboratorio, se puede recurrir a algún procedimiento para alterar esas cubiertas:

- ✓ Tratando las esporas a altas temperaturas, pero inferiores a su inactivación (100°C durante unos minutos)
- ✓ Por radiaciones ionizantes
- ✓ Por pH bajos
- ✓ Por tratamiento con sustancias que posean grupos -SH libres (β -mercaptoetanol).



ii. ACTIVACIÓN



Es una etapa aún reversible, desencadenada por un agente químico externo (germinante) presente en el medio.

Este agente es variable según las especies:

- ✓ Iones inorgánicos (Mn^{2+} , Mg^{2+})
- ✓ L-alanina en *B. subtilis*
- ✓ Glucosa u otros azúcares
- ✓ Adenina u otras bases nitrogenadas

- ❖ El germinante es detectado por un receptor alostérico a nivel de la membrana interna.
- ❖ Una vez que el receptor se activa, adquiere una capacidad proteolítica específica que le permite romper una proenzima que hasta ese momento se encontraba unida covalentemente al peptidoglucano de la corteza.
- ❖ La enzima resultante reconoce la lactama del Ácido N-acetilmurámico y comienza a hidrolizar el peptidoglucano cortical.
- ❖ La consecuencia es que comienza a entrar H_2O al protoplasto, por lo que la espora pierde su característica refringencia, y se comienza a perder la resistencia al calor.
- ❖ Durante toda esta etapa el metabolismo está aún latente.



iii. INICIACIÓN O GERMINACIÓN EN SENTIDO ESTRICTO

En esta etapa la germinación se hace ya irreversible, y se rompe definitivamente el estado de dormancia, si bien el metabolismo es endógeno (no depende todavía de sustancias externas).

Los principales acontecimientos bioquímicos son:

- ✓ Se pierde DPA, lo que supone pérdida de Ca^{++} ;**
- ✓ Este Ca^{++} pasa al córtex, donde neutraliza las cargas negativas;**
- ✓ Se favorece la rehidratación del protoplasto y su hinchamiento, favorecido por la concomitante contracción del córtex, mientras continúa y se completa rápidamente la hidrólisis del peptidoglicano cortical;**
- ✓ El 3-fosfoglicérico (3-PG) se convierte en 2-PG, y éste en PEP, que a su vez dona su fosfato de alta energía para producir ATP;**
- ✓ Las pequeñas proteínas SASPs se hidrolizan por una proteasa específica que hasta ese momento estaba inactiva. De este modo los aminoácidos constituyentes de las SASPs se reutilizan para la síntesis de nuevas proteínas por parte de la pequeña dotación de ribosomas y demás moléculas accesorias;**
- ✓ La ARN polimerasa comienza a sintetizar ARN (comienza la transcripción de genes vegetativos).**

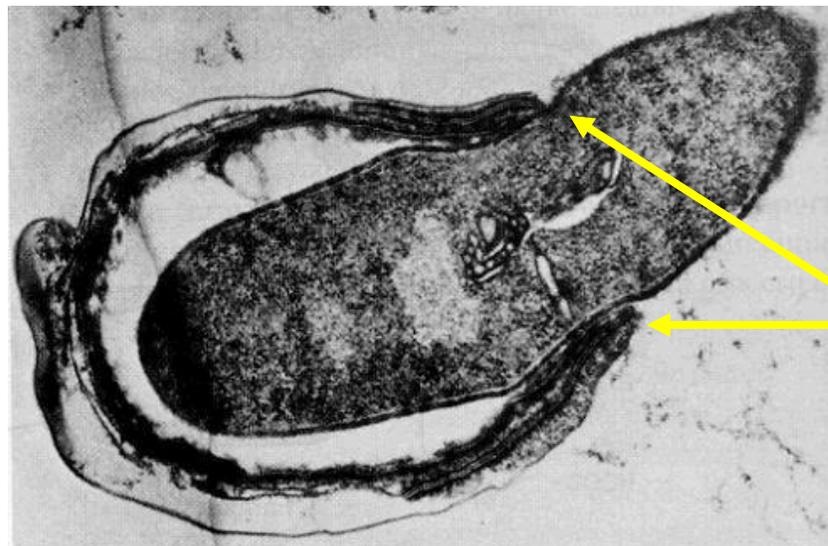
iv. TERMINACIÓN Y CRECIMIENTO ULTERIOR

Aparece ya el metabolismo exógeno, de modo que la espora puede tomar nutrientes del exterior y metabolizarlos.

Los eventos bioquímicos y estructurales más notorios son:

- ✓ Se sintetiza ADN;
- ✓ El protoplasto crece aún más;
- ✓ La pared de la espora sirve como cebador (germen) para la producción de la pared de la célula vegetativa naciente;
- ✓ La célula vegetativa sale por rotura de las cubiertas, que puede ser de tipo polar o ecuatorial.

Salida de la nueva célula vegetativa al final de la germinación



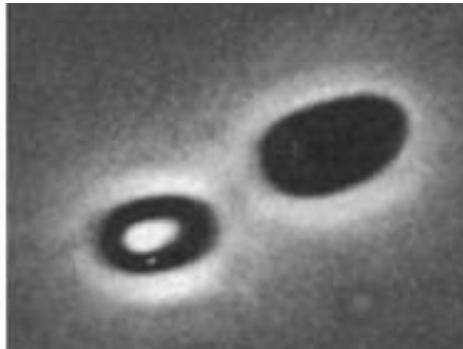
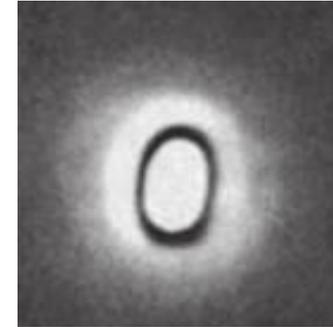
rotura de las cubiertas

Al salir la célula vegetativa se tiñe como Gram -, y adquirirá su grampositividad después de la primera división.

GERMINACIÓN DE ENDOSPORA EN *Bacillus*

Conversión de una endospora a célula vegetativa

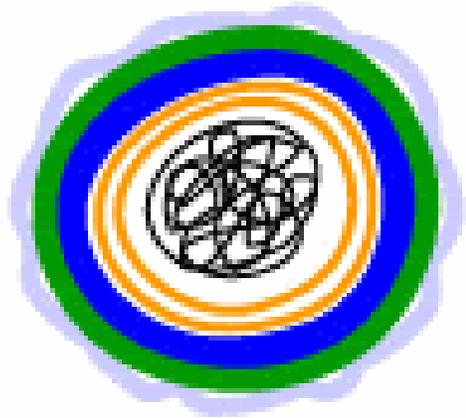
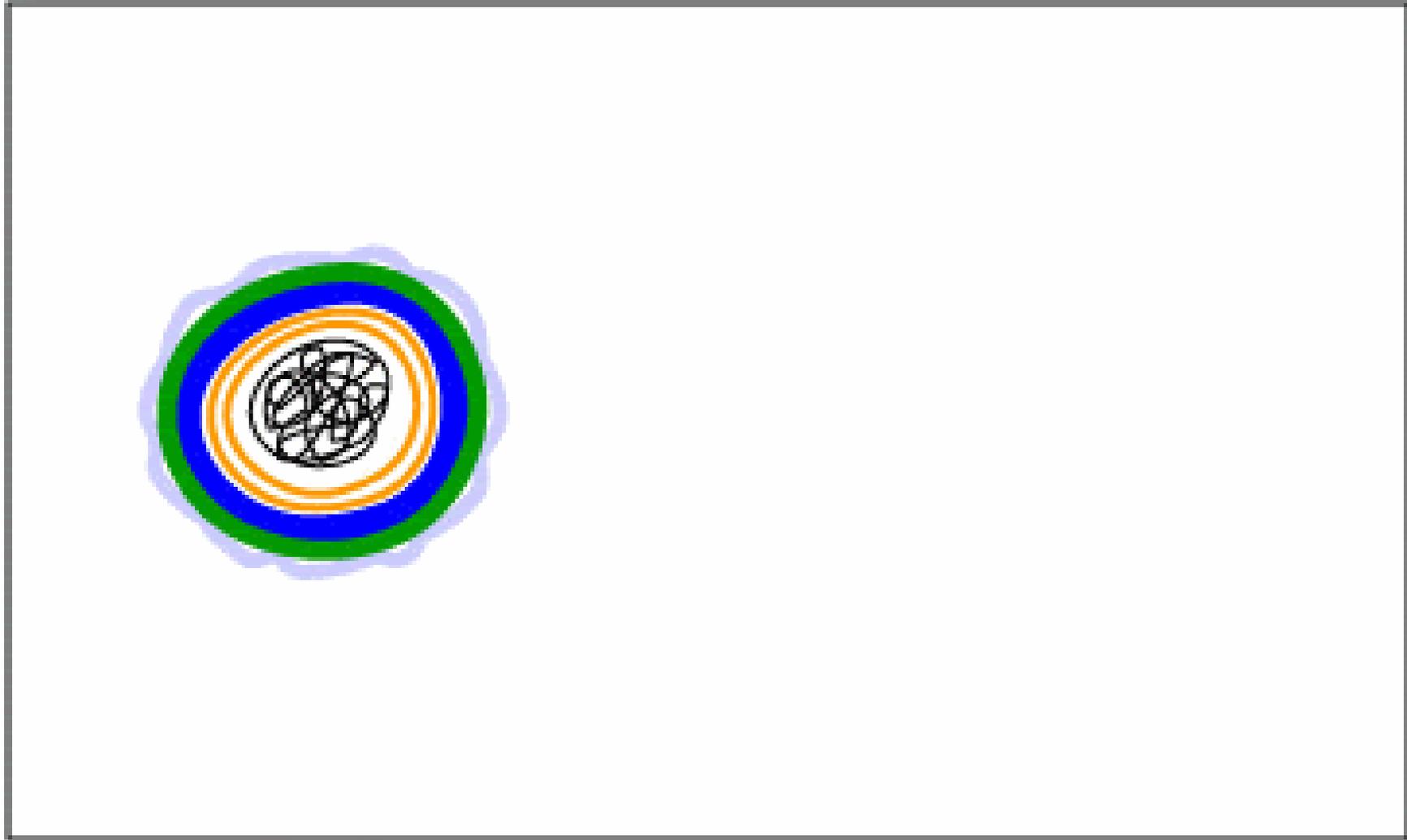
Espora madura muy refringente



La activación origina una pérdida de refractibilidad.

Emergencia de nuevas células vegetativas

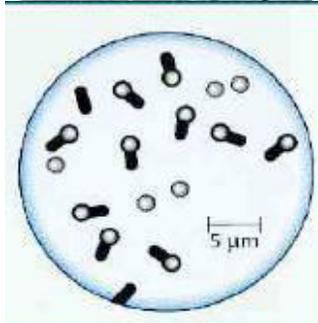




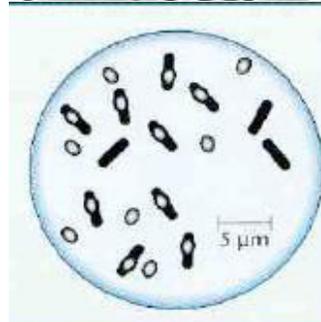
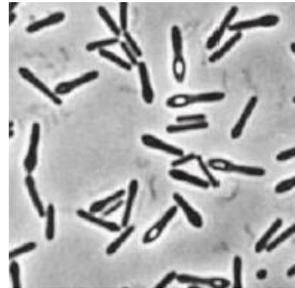
TÉCNICA DE LA COLORACIÓN DE ESPORAS DE SHAEFFER Y FULTON

- ❖ La endospora es resistente también a los colorantes.
- ❖ Sin embargo, existen colorantes como el verde malaquita que, con ayuda del calor, pueden penetrar en ella.
- ❖ Una vez teñidas, no perderán el colorante en el lavado con agua debido a las características de su envoltura, y sí lo harán las formas vegetativas, que quedarán teñidas con el colorante de contraste.
- ❖ La posición y morfología de las esporas en el interior de la bacteria tiene interés taxonómico, ya que es de utilidad para diferenciar especies dentro de un mismo género.

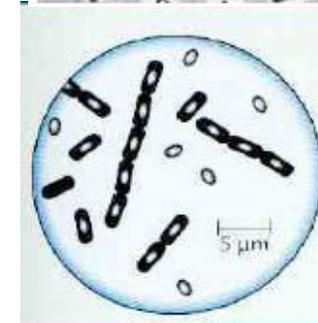
Terminales

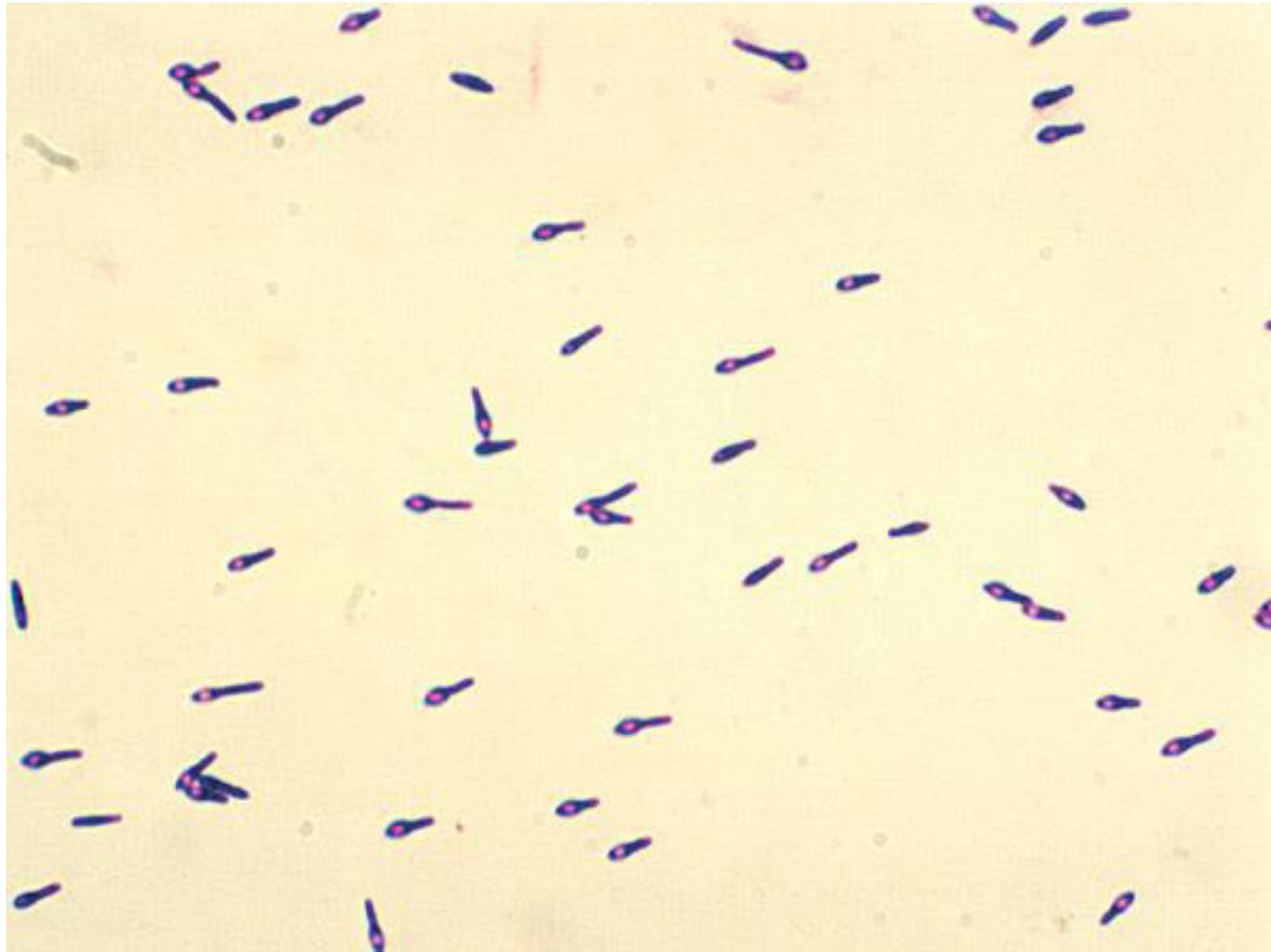


Subterminales



Centrales





Clostridium botulinum

¿CUÁNTO TIEMPO PUEDE SOBREVIVIR UNA ESPORA?



- ❖ Datos publicados sobre la longevidad de las esporas indican que pueden permanecer viables (capaces de germinar para dar células vegetativas) como mínimo durante varias décadas y probablemente durante mucho más.
- ❖ En 1981 se colocó en un medio de cultivo estéril una suspensión de esporas de *Clostridium acetivum* preparada en 1947 y comenzó a crecer en menos de 12 h dando lugar a un cultivo.
- ❖ *Clostridium acetivum* fue aislado en 1940 y se creyó que el vial con las esporas se había perdido, hasta que fue encontrado en un almacén de la Universidad de California y posteriormente reactivado.
- ❖ El análisis microbiológico de los restos arqueológicos romanos hallados en el Reino Unido, y datados hace unos 2.000 años, permitieron descubrir un gran número de esporas viables de *Thermoactinomyces* en distintas muestras de residuos.
- ❖ También se recuperaron esporas de *Thermoactinomyces* en fracciones de estratos de sedimentos en un lago de Minnessota con una antigüedad de unos 7.000 años.

Las endosporas resisten varios miles de años



¿ES ÉSTE EL LÍMITE?

- ❖ Uno de los factores más importantes que se ha tenido en cuenta es la radiación cósmica, que puede producir mutaciones en el ADN.
- ❖ Se ha supuesto que, durante miles de años, los efectos acumulativos de la radiación cósmica podrían producir multitud de mutaciones en el genoma de un organismo, capaces de afectar incluso a estructuras tan resistentes como las endosporas; estas terminarían por morir debido a las lesiones genéticas producidas.

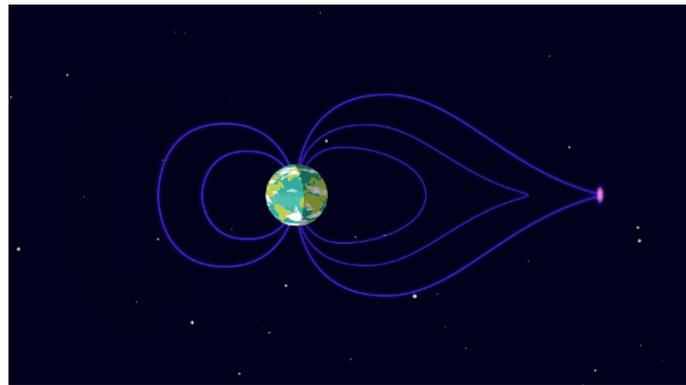
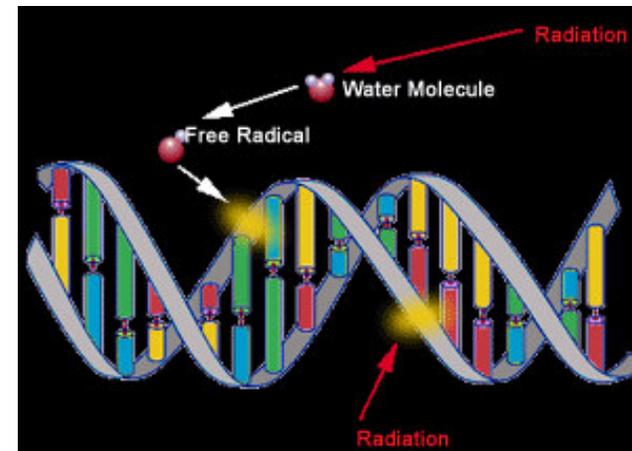


Image courtesy of the Earth Science and Remote Sensing Unit, NASA Johnson Space Center. Editing: Hiral Marmora



- ❖ En 1995 se logró la resurrección de endosporas bacterianas cuya edad se estimaba en 25-40 millones de años, preservadas en intestinos de una abeja extinta atrapada en ámbar.
- ❖ La presencia de bacterias formadoras de endosporas en estas abejas se había sospechado ya en estudios de microscopía electrónica del intestino de insectos que tenían estructuras parecidas a las endosporas en los que se había recuperado ADN similar al de *Bacillus*.
- ❖ Las muestras de tejido de abeja se incubaron en un medio de cultivo que rápidamente permitió el desarrollo de bacterias formadoras de endosporas.



- ❖ También se aislaron bacterias halófilas formadoras de endosporas a partir de inclusiones en cristales salinos procedentes del período Pérmico (>250 millones de años).
- ❖ Estas bacterias quedaron atrapadas dentro del cristal de salmuera cuando se formó y han permanecido viables durante tantos años.
- ❖ Experimentos moleculares sobre un material de halita todavía más antiguo (unos 450 millones de años) presentan evidencias sobre células procariotas.



¿ES ÉSTE EL LÍMITE MÁXIMO?

- ❖ Las endosporas almacenadas en condiciones adecuadas pueden permanecer viables indefinidamente.
- ❖ Esto es un testimonio notable de que la endospora, una estructura que apareció evolutivamente para ayudar a las células a mantener su viabilidad durante períodos relativamente cortos, ha sido tan bien diseñada que incluso puede permanecer en estado latente y en estado viable por cientos de miles o millones de años.





PRINCIPALES MECANISMOS DE TRANSPORTE ESPECIALIZADO EN PROCARIOTAS



Necesidad de proteínas transportadoras

- ❖ Las proteínas transportadoras hacen algo más que transportar sustancias a través de la membrana, también son capaces de acumular solutos dentro de la célula contra un gradiente de concentración.
- ❖ Si los solutos entraran únicamente por difusión, en las células nunca se alcanzaría la concentración intracelular necesaria para que las reacciones bioquímicas tengan lugar, y se debe a 2 razones:
 1. Pocas sustancias difunden a través de la membrana citoplasmática,
 2. Incluso si los solutos pasaran la membrana por difusión, su velocidad de entrada y su concentración intracelular sería solamente proporcional a su concentración en el exterior, que en condiciones naturales es a menudo muy baja.
- ❖ Por tanto es necesario que la célula disponga de mecanismos para la acumulación de solutos que son nutrientes vitales, a niveles mucho mayores que los presentes en sus hábitats, y esto es la función de los sistemas de transporte.

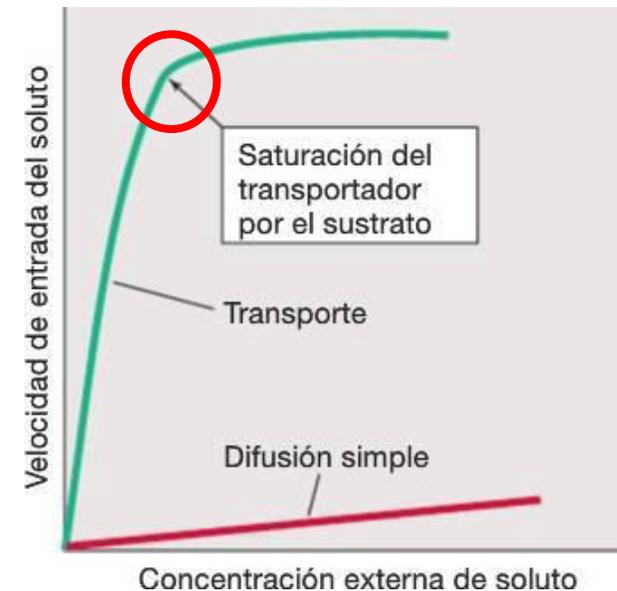
PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS



SISTEMAS DE TRANSPORTE MEDIADOS POR TRANSPORTADORES

- ❖ A diferencia del transporte por difusión simple, muestran un efecto de saturación, es decir, si la concentración de sustrato es lo suficientemente alta como para saturar al transportador (lo que puede ocurrir incluso a las concentraciones muy bajas de sustrato que se encuentran en la naturaleza), la velocidad de entrada alcanza un máximo y la adición de más sustrato no incrementa la velocidad.
- ❖ Esta propiedad de las proteínas transportadoras favorece que las células concentren nutrientes a partir de ambientes en los que las sustancias se encuentran con frecuencia muy diluidas.

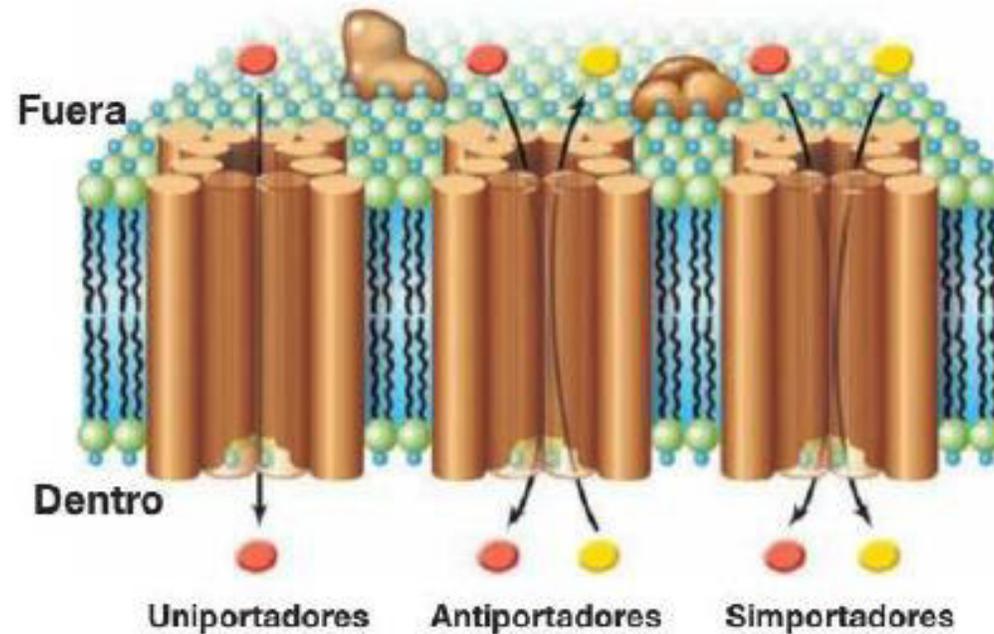
La velocidad muestra saturación a concentraciones externas relativamente bajas.



ESTRUCTURA DE TRANSPORTADORES TRANSMEMBRANALES Y TIPOS DE PROCESOS DE TRANSPORTE

En los procariotas, los transportadores transmembranales contienen por lo general 12 moléculas proteicas (cilindros) que se agregan formando un canal a través de la membrana.

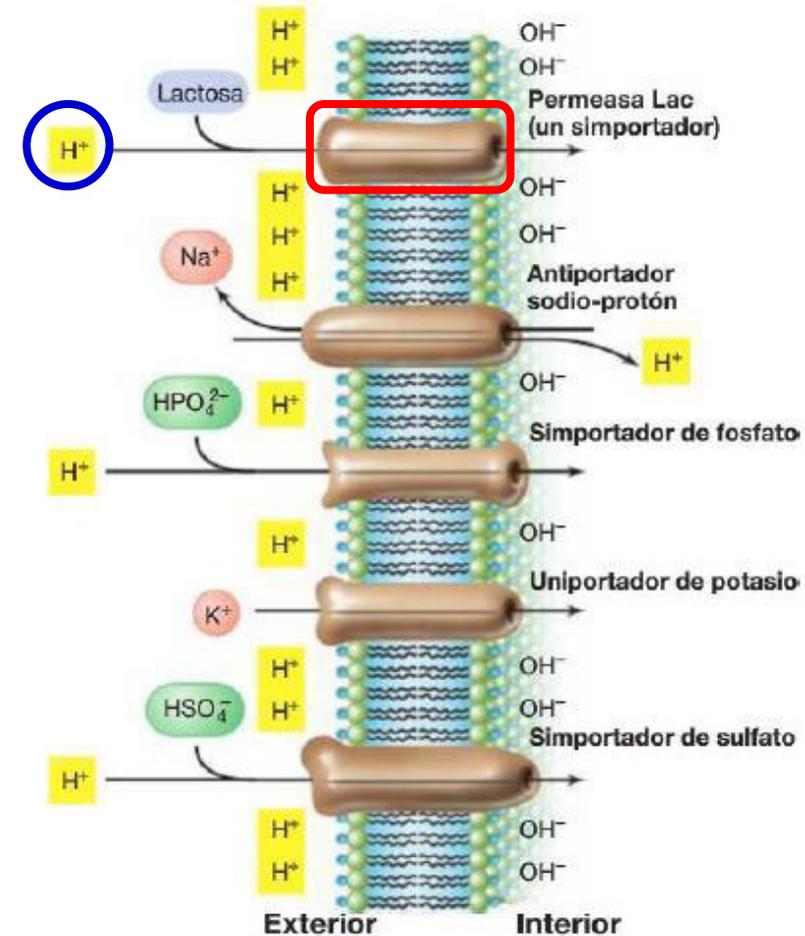
3 transportadores con diferentes tipos de transporte



● sustancia co-transportada

Transporte simple: La permeasa Lac de *Escherichia coli*

- ❖ *E. coli* metaboliza lactosa, incorporandola mediante una proteina transportadora simple llamada permeasa Lac que es un simportador.
- ❖ La actividad de la permeasa Lac requiere energía.
- ❖ A medida que las moléculas de lactosa entran en la célula, la energía de la fuerza motriz de H^+ va disminuyendo por el co-transporte de H^+ al citoplasma.
- ❖ La potencia de la fuerza motriz de H^+ se reestablece mediante reacciones que producen energía.
- ❖ El resultado final de la actividad de la permeasa Lac es la acumulación de lactosa en el interior celular a expensas de un consumo de energía.



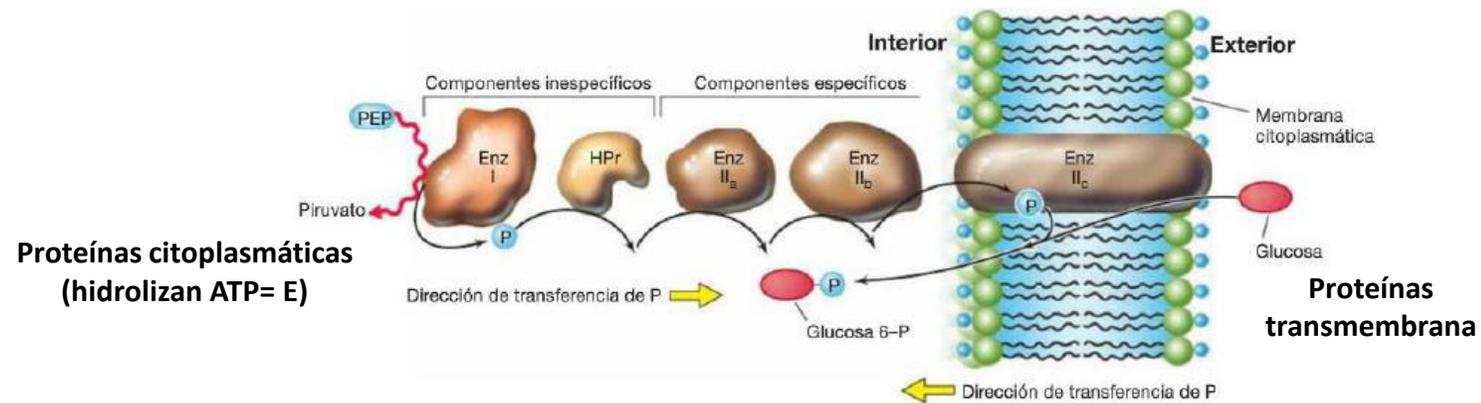
Comparación de la actividad de la permeasa Lac con la de otros transportadores simples, incluyendo uniportadores y antiportadores.

TRANSLOCACIÓN DE GRUPO: EL SISTEMA FOSFOTRANSFERASA



- ❖ La translocación de grupo es un tipo de transporte en el que la sustancia transportada resulta químicamente modificada durante el transporte.
- ❖ Los casos mejor estudiados son el transporte de los azúcares glucosa, manosa y fructosa en *E. coli*.
- ❖ Estos compuestos son modificados por fosforilación mediante el sistema de la fosfotransferasa durante el transporte.

SISTEMA PARA EL TRANSPORTE DE GLUCOSA por ABC (*ATP-Binding Casette*)



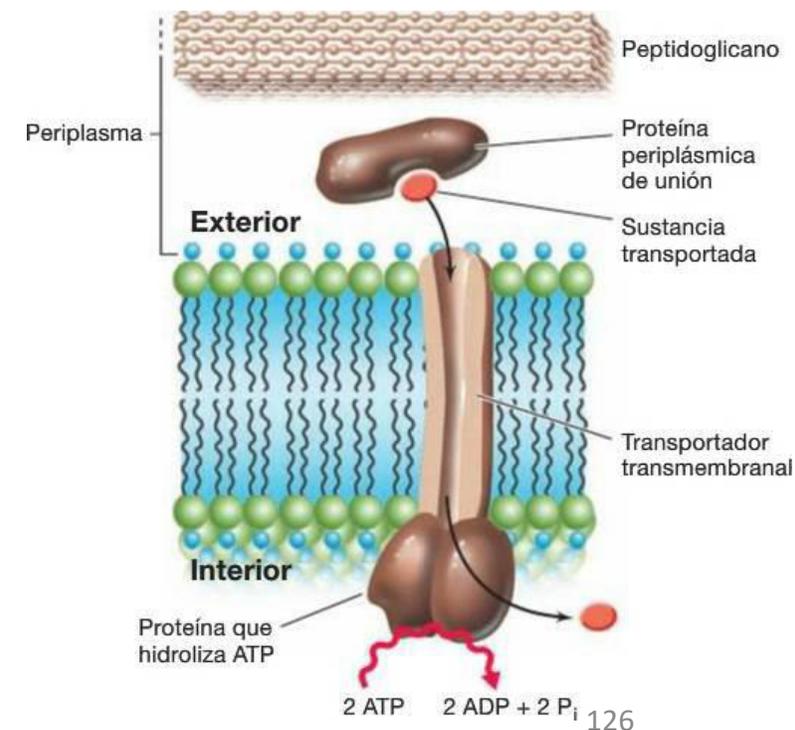
- Consta de 5 proteínas: enzima (Enz) I, enzimas Iia, Iib y Iie, y HPr.
- La transferencia secuencial del fosfato tiene lugar desde el fosfoenolpiruvato (PEP) a través de las proteínas hasta la enzima Iie, que es la auténtica responsable del transporte y fosforilación del azúcar.
- Las proteínas HPr y Enz I son inespecíficas y transportan cualquier azúcar, mientras que los componentes de EnzII son específicos para cada azúcar particular.



Proteínas periplásmicas de unión y el sistema ABC



- ❖ El periplasma contiene diversas proteínas, muchas de las cuales funcionan en sistemas de transporte y se denominan proteínas periplásmicas de unión.
 - ❖ Los sistemas de transporte que utilizan proteínas periplásmicas de unión junto con un transportador de membrana y con proteínas capaces de hidrolizar ATP se denominan sistemas de transporte ABC (*ATP-Binding Casette*).
 - ❖ En procariontes se han identificado más de 200 sistemas diferentes de transporte ABC que están relacionados con la entrada de compuestos orgánicos como azúcares o aminoácidos, y de nutrientes inorgánicos como sulfato, fosfato y trazas de metales.
-
- ✓ Una de las características propias de los transportadores ABC es la alta afinidad de sustrato que presentan las proteínas periplásmicas de unión.
 - ✓ Estas proteínas pueden unir sus sustratos incluso cuando están presentes a concentraciones muy bajas, $\approx 1 \mu\text{molar}$ (10^{-6} M).
 - ✓ Una vez que han atrapado el sustrato correspondiente, el complejo interacciona con el respectivo componente transmembranal que transporta el sustrato gracias a la energía liberada por la hidrólisis del ATP.
 - ✓ Aunque las Gram + carecen de periplasma, también poseen sistemas ABC.
 - ✓ Sin embargo, en este caso las proteínas específicas de unión al sustrato se anclan en la cara externa de la membrana citoplasmática.
 - ✓ Como en las gram -, una vez que ocurre la unión con su sustrato, estas proteínas interaccionan con los elementos transmembranales y tiene lugar el transporte a través de la membrana a expensas del gasto de ATP.

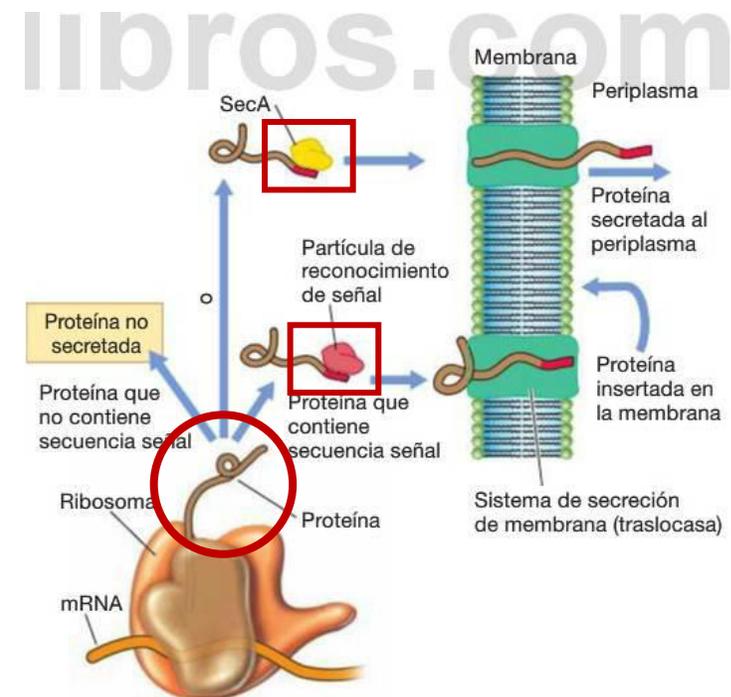




¿Cómo se realiza el transporte de moléculas grandes, como las proteínas?

- ❖ Para su correcto funcionamiento, muchas proteínas necesitan ser transportadas fuera de la membrana citoplasmática o insertarse en ella de modo específico.
- ❖ En procarióticas esto se lleva a cabo gracias a la actividad de proteínas *translocasas*; unas de las más importantes constituyen el sistema Sec (sistema de secreción).
- ❖ Este sistema actúa tanto para exportar proteínas como para insertarlas en la membrana.
- ❖ Las proteínas destinadas al transporte son reconocidas por el sistema Sec porque están marcadas de manera específica.

- ✓ La secuencia señal es reconocida por SecA o por la **PARTÍCULA DE RECONOCIMIENTO DE SEÑAL**, que transporta la proteína al sistema de secreción de membrana.
- ✓ La partícula de reconocimiento de señal se une a las proteínas que se insertan en la membrana, mientras que SecA se une a las proteínas que son secretadas a través de la membrana.
- ✓ En las bacterias gramnegativas, éstas últimas se secretarán al espacio periplasmático.





GRACIAS



POR SU ATENCION