

Tema 2.- Crecimiento y muerte de microorganismos. *Concepto y expresión matemática del crecimiento bacteriano. Concepto de muerte de un microorganismo. ¿Qué necesita un microorganismo para crecer?. Detección y medida del crecimiento. Ciclo de crecimiento de poblaciones. Factores físicos y químicos que influyen en el crecimiento. Multiplicación de los virus.*

1.- CONCEPTO Y EXPRESIÓN MATEMÁTICA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO.

Entendemos por **crecimiento microbiano** el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. Por tanto, no nos referimos al crecimiento de un único microorganismo (*ciclo celular*) sino al demográfico de una población. En este tema nos centraremos en el **crecimiento de bacterias**, el estudio que se hace puede servir también para entender el crecimiento de levaduras y de otros hongos. El crecimiento de los virus se produce de otra forma diferente y será tratado al final de este capítulo.

Denominamos **ciclo celular** al proceso de desarrollo de una bacteria considerada de forma aislada. A lo largo del ciclo celular, tiene lugar la replicación del material de la bacteria, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento para alcanzar un tamaño doble del inicial y su división por bipartición de la bacteria para dar lugar a dos células hijas. La duración del ciclo celular coincide con el tiempo de generación y depende, en general, de los mismos factores de los que depende este.

El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos sus individuos. Este crecimiento suele ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular. Por consiguiente, en un momento determinado en una población se encuentran células que acaban de dividirse, otras que están replicando su ADN y elongándose, otras que están iniciando la división celular, etc.

En un crecimiento sincrónico todas las células se encuentran simultáneamente en la misma fase del crecimiento celular. Los cultivos sincrónicos son muy difíciles de mantener por lo que su importancia está principalmente ligada a los estudios básicos de biología microbiana. Sin embargo, en la naturaleza, las bacterias del suelo se encuentran en condiciones de crecimiento próximas a la fase estacionaria (en la que se produce una cierta sincronización del cultivo) y, por consiguiente, durante cierto tiempo las poblaciones naturales probablemente se comporten como relativamente sincrónicas.

Las poblaciones de bacterias pueden crecer de una **forma explosiva** acumulando grandes números en un periodo de tiempo muy reducido. Puesto que el efecto nocivo (infecciones o intoxicaciones) de los microorganismos depende de su número en la mayoría de los casos, entender cómo se produce el crecimiento microbiano es importante para poder evitar o reducir dichos efectos nocivos.

Se denomina **crecimiento equilibrado** a aquél en el que todos la biomasa, número de células, cantidad de proteínas, de ADN, etc., evolucionan en paralelo. El crecimiento equilibrado probablemente ocurra en muy contadas ocasiones en condiciones naturales.

Por tanto, es principalmente un concepto de aplicación en el laboratorio. Sin embargo, es útil porque permite estudiar el crecimiento microorganismos.

Las bacterias crecen siguiendo una **progresión geométrica** en la que el número de individuos se duplica al cabo de un tiempo determinado denominado **tiempo de generación** (τ). De esta forma, podemos calcular el número de bacterias (N) al cabo de un número de generaciones (n) usando la ecuación siguiente:

$$N = N_0 2^n$$

siendo N_0 el número de células en el momento actual. El número de generaciones se puede calcular de la siguiente forma:

$$n = t / \tau$$

donde t es el tiempo transcurrido.

Los tiempos de generación de bacterias creciendo en ambientes favorables pueden ser muy cortos (valores de τ de 20 min). Esto lleva a que una única célula ($N_0 = 1$) creciendo con un $\tau = 20$ min, llegue a poder producir 4.7×10^{21} células en 24 horas.

Si la bacteria crece en un medio líquido, las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente en la mayoría de los casos formando una **suspensión** de células libres.

Cuando una célula aislada comienza a crecer sobre un substrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una **colonia**. Se denomina **unidad formadora de colonia (UFC)** a una célula viva y aislada que se encuentra en un substrato y en condiciones ambientales adecuadas y produce una colonia en un breve lapso de tiempo. Una UFC también puede corresponder a más de una célula cuando éstas forman parte de grupos unidos fuertemente (estreptococos o diplococos, por ejemplo) ya que cada grupo formará una sola colonia.

Cuando algunos tipos de bacterias o de levaduras patógenas crecen sobre superficies forman **biopelículas (biofilms)** en los que las células se asocian entre sí mediante capas de polisacáridos que forman una película que recubre la superficie sobre la que se encuentran las células. Los biofilms son muy importantes porque los microorganismos que los forman resultan más resistentes a antibióticos y al ataque de células del sistema inmune y, por consiguiente, las infecciones que producen son más difíciles de tratar. La presencia de biopelículas es un problema serio en los implantes ortopédicos, catéteres, etc. El sarro de los dientes es un ejemplo de biofilm.

2.- CONCEPTO DE MUERTE DE UN MICROORGANISMO.

Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse. El fundamento de esta definición es que si un microorganismo ha perdido la capacidad de dividirse no podrá formar una colonia sobre un medio de cultivo y no será posible detectar su presencia por los métodos microbiológicos tradicionales. Es decir: cuando no se produce aumento en el número de

microorganismos no hay crecimiento. Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad metabólica que se traduzca, por ejemplo, en liberación de toxinas.

Por otra parte, hay que considerar que la capacidad de multiplicación (crecimiento) de un microorganismo puede verse transitoriamente afectada por lesiones o por las condiciones físicas o químicas del entorno. En estos casos, podríamos considerar como muertos microorganismos que pueden reanudar su crecimiento si las condiciones son de nuevo favorables.

3.- ¿QUÉ NECESITA UN MICROORGANISMO PARA CRECER?

El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la producción de **colonias aisladas** en cultivos sólidos. El crecimiento explosivo de las bacterias produce un gran número a partir de una única célula inicial de forma que, tras un periodo de tiempo de **incubación** en las condiciones ambientales adecuadas, se produce una colonia de individuos iguales.

Para crecer, un microorganismo necesita nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares. Dependiendo de la fuente de carbono que utilizan, los microorganismos se pueden clasificar en **autótrofos** si es el CO₂ atmosférico (microorganismos que fotosintetizan) y **heterótrofos** si utilizan carbono orgánico. Los microorganismos de importancia clínica son todos ellos heterótrofos.

La **fórmula elemental** de un microorganismo es, aproximadamente,



lo que supone que los componentes de las células son: **carbono** que representa alrededor del 50% del peso seco, **oxígeno** (32%), **nitrógeno** (14%) y debe estar disponible, normalmente, en forma de NH₄ o de aminoácidos a los que se pueda tomar su grupo amino; **fósforo** (3%) y debe estar en forma de PO₄³⁻, **azufre** que representa en torno al 1% y procede de aminoácidos sulfurados o de SO₄²⁻; y otros **elementos traza** entre los que se encuentran Fe, K, Mg, Mn, Co, Mb, Cu y Zn.

La elaboración de **medios de cultivo** que permitan aislar microorganismos a fin de iniciar posteriores **cultivos puro** o **axénicos** requiere proporcionar los nutrientes antes citados y, en ciertos casos, algunos aminoácidos o **vitaminas** que determinados tipos de microorganismos no pueden sintetizar.

Los medios de cultivo se pueden clasificar en **definidos** cuando su composición química se conoce totalmente y **complejos** cuando no es el caso porque están compuestos por mezclas de extractos de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, etc.).

Por otra parte, los medios de cultivo pueden ser **líquidos** o bien **sólidos** si se añade algún agente solidificante que no sea consumible por los microorganismos (normalmente **agar**).

En función de los microorganismos que pueden crecer en ellos, los medios pueden ser **generales**, **selectivos** cuando favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos mientras suprimen el de otros (por ejemplo, el medio SPS para clostridios), **diferenciales** cuando alguno de sus componentes permite identificar las colonias de un tipo de microorganismos (por ejemplo medios con hematófagos para identificar colonias de microorganismos hemolíticos), **selectivo-diferenciales** cuando combinan las dos características anteriores (por ejemplo, el agar de MacConkey para identificar *Escherichia coli*), y **medios de enriquecimiento** que permiten aislar un tipo determinado de microorganismo a partir de una mezcla una población mixta de gran tamaño.

4.- DETECCIÓN Y MEDIDA DEL CRECIMIENTO

Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos. Los principales, se enumeran a continuación:

Recuento directo: consiste en la observación al microscopio de volúmenes muy pequeños de suspensiones de bacterias. Se usan unos portaobjetos especiales denominados **cámaras de Petroff-Hausser**. Para que la medida sea correcta es necesario que la densidad de células sea del orden de 10^5 por ml.

Medida de la masa de células: el sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. La turbidez depende de la masa en suspensión y, por tanto, midiendo esta se puede estimar aquella. Este es el parámetro de medida más fácil de usar en los cultivos de laboratorio. La densidad de células debe ser del orden de 10^5 por ml.

Recuento de viables: consiste en sembrar un volumen determinado de cultivo o muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado para estimar el número de viables contando el número de colonias que se forman puesto que cada una de estas deriva de una UFC. Para que la medida sea correcta desde el punto de vista estadístico, es necesario contar más de 300 UFC.

En ciertas ocasiones en las que la densidad de microorganismos es demasiado baja, éstos se pueden recolectar por filtración a través de una membrana (de $0.2 \mu\text{m}$ de tamaño de poro) y posterior colocación de la membrana en un medio de cultivo adecuado para que se formen las colonias.

Medida del número de partículas usando contadores electrónicos de partículas. Estos sistemas no nos indican si las partículas corresponden a células vivas o muertas; pero nos pueden dar una idea del tamaño de las partículas.

Medida de parámetros bioquímicos tales como la cantidad de ADN, ARN, proteínas, peptidoglicano, etc. por unidad de volumen.

Medida de actividad metabólica de las bacterias como que respiran producen una disminución del potencial redox del medio en que se encuentran como consecuencia del

consumo de oxígeno (utilización de colorantes sensibles a oxidación-reducción tales como el azul de metileno).

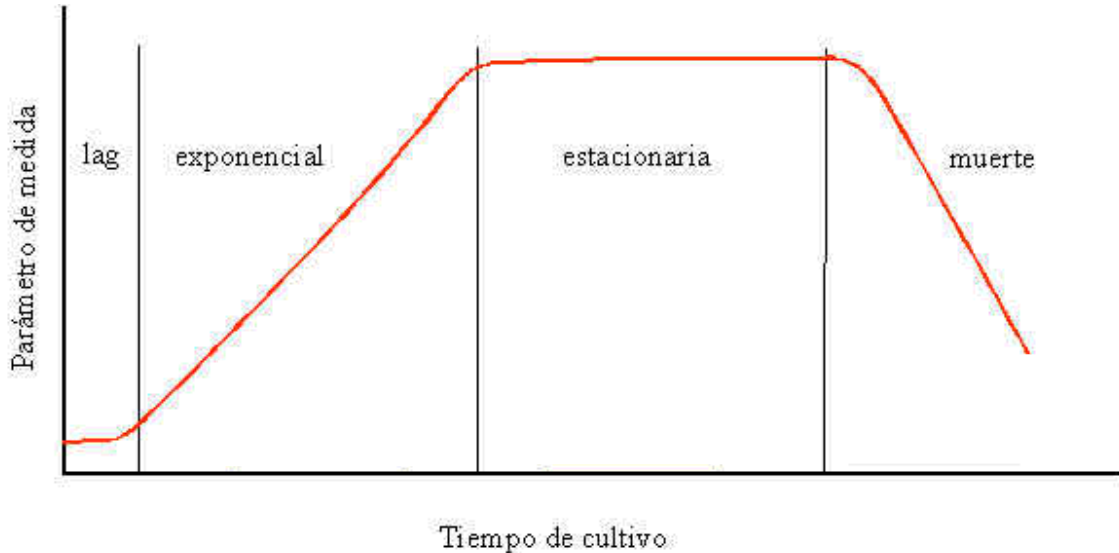
5.- CICLO DE CRECIMIENTO DE POBLACIONES.

En un cultivo bacteriano en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano:

Fase lag o de adaptación: Durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial.

Fase exponencial o logarítmica: en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima. La evolución del número de células durante esta fase se explica con el modelo matemático descrito anteriormente. Esta fase corresponde a la de infección y multiplicación dentro del organismo del agente infeccioso.

Fase estacionaria: en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase de exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia en el curso de las infecciones o intoxicaciones producidas por bacterias.



Los microorganismos entran en fase estacionaria bien porque se agota algún nutriente esencial del medio, porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento.

La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en muchos ambientes naturales.

Fase de muerte: se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo.

Las fases, parámetros y cinética de crecimiento discutidas para el caso de los medios líquidos se presentan también en los sólidos. La cinética de crecimiento, en este caso, sólo se puede seguir utilizando unos sistemas de detección especiales siendo el más sencillo, la medida del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa.

6.- FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO.

Temperatura: Cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Si consideramos la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, podemos observar una **temperatura mínima** por debajo de la cual no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la **temperatura óptima** a la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular.

El aumento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura. Se denomina **coeficiente de temperatura** a la relación entre el incremento de la velocidad de reacción y el de temperatura. En términos generales, la velocidad de las reacciones bioquímicas suele aumentar entre 1.5 y 2.5 veces al aumentar 10°C la temperatura a la que tienen lugar.

La falta de crecimiento a temperaturas bajas se debe a la reducción de la velocidad de las reacciones bioquímicas y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular.

La muerte celular a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas.

Es importante tener en cuenta que a temperaturas bajas, el metabolismo celular es lento y las células paran de crecer; aunque suelen morir. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar su capacidad de división si baja posteriormente la temperatura. Esto permite esterilizar por calor y no por frío.

Hay varios **tipos de microorganismos** en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima.

Tipo de microorganismo	Temperatura mínima	Temperatura óptima	Temperatura máxima
Psicrófilo	-5 +5	12 - 15	15 - 20

Psicrótrofo	-5 +5	25 - 30	30 - 35
Mesófilo	5 - 15	30 - 45	35 - 47
Termófilo	40 - 45	55 - 75	60 - 90

Los microorganismos psicrótrofos son mesófilos que pueden crecer a temperaturas bajas. Por tanto, se les puede considerar como psicrófilos facultativos. Esto es importante desde el punto de vista aplicado porque cuando se encuentran contaminando alimentos, son capaces de crecer en condiciones de refrigeración (4 - 8°C) y de producir infecciones en los consumidores del alimento (30 - 35 °C).

Desde el punto de vista clínico, los microorganismos capaces de producir infecciones en pacientes son los mesófilos y algunos psicrótrofos ya que sus temperaturas óptimas de crecimiento coinciden con las corporales.

Actividad de agua (a_w): Se denomina actividad de agua a la relación entre la presión de vapor de agua del substrato de cultivo (P) y la presión de vapor de agua del agua pura (P_0). El valor de la actividad de agua está relacionado con el de la humedad relativa (HR).

El valor de la actividad de agua nos da una idea de la cantidad de agua disponible metabólicamente. Por ejemplo: comparemos el agua pura donde todas las moléculas de agua están libremente disponibles para reacciones químicas con el agua presente en una disolución saturada de sal común (NaCl) donde una parte importante de las moléculas de agua participa en la solvatación de los iones de la sal disuelta. En este último caso, la actividad de agua mucho menor que en el primero. conforme aumenta la cantidad de solutos en el medio, disminuye su actividad de agua.

El agua es un substrato en muchas reacciones bioquímicas (proteasas y lipasas, por ejemplo). Cuando no hay agua disponible, estas reacciones se detienen y el metabolismo se para. Esta falta de agua también detiene muchas de las enzimas que podrían degradar las estructuras biológicas. Por ello, las células que no crecen por falta de agua no mueren rápidamente: los sistemas de degradación tampoco funcionan y no las degradan. Es decir: cuando un microorganismo se encuentra en un substrato con actividad de agua menor que la que necesita, su crecimiento se detiene. Esta detención del crecimiento no suele llevar asociada la muerte del microorganismo, sino que éste se mantiene en condiciones de resistencia durante un tiempo más o menos largo. En el caso de las esporas, la fase de resistencia puede ser considerada prácticamente ilimitada.

La gran mayoría de los microorganismos requiere valores de actividad de agua muy altos para poder crecer. Los valores mínimos de actividad para diferentes tipos de microorganismos son, a título orientativo, los siguientes: bacterias $a_w > 0.90$, levaduras $a_w > 0.85$, hongos filamentosos $a_w > 0.80$. Como puede verse, los hongos filamentosos son capaces de crecer en substratos con actividad de agua menor (más secos) de la que permite el crecimiento de bacterias o de levaduras. Por esta razón se puede producir deterioro de alimentos de baja actividad de agua (por ejemplo, el queso o almíbar) por mohos (hongos filamentosos) y no por bacterias.

En función de su tolerancia a ambientes con baja a_w , los microorganismos que pueden crecer en estas condiciones se clasifican en **halotolerantes**, **halófilos** y **xerófilos** según toleren o requieran condiciones salinas o hipersalinas, respectivamente.

La reducción de la actividad de agua para limitar el crecimiento bacteriano tiene importancia aplicada en industria alimentaria. La utilización de almíbaros, salmueras y salazones reduce la actividad de agua del alimento para evitar su deterioro bacteriano.

pH: Es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente, fuera de este rango muere.

El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplásmica. El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6,0 a 8,0.

Los rangos de pH tolerables por diferentes tipos de microorganismos son, también, distintos. Hay **microorganismos acidófilos** que pueden vivir a pH=1.0 y otros **alcalófilos** que toleran pH=10.0

Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de crecimiento suele tender a bajar durante el cultivo. Por otra parte, la bajada del pH del medio que producen ciertos microorganismos les confiere una **ventaja selectiva** frente a otros competidores. Así, por ejemplo, las bacterias lácticas que producen grandes cantidades de ácido láctico como consecuencia de su metabolismo primario reducen el pH del medio a valores inferiores a los soportables por otras bacterias competidoras (llegan a bajar el pH del medio hasta 4.5). De esta forma, las bacterias competidoras mueren y las lácticas se convierten en la población dominante.

La bajada del pH se puede deber a varios factores, uno de los cuales es la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, láctico) por ciertas bacterias. En este sentido, hay que tener en cuenta que la acción bactericida de estos ácidos orgánicos de cadena corta es más potente que la debida únicamente a la bajada del pH que producen. Esto es, los ácidos orgánicos de cadena corta son tóxicos para algunas bacterias por sí mismos.

El efecto letal del pH ácido sobre los microorganismos tiene **aplicación** en la conservación de alimentos acidificándolos. De esta forma, la adición de ácido acético en forma de vinagre permite la conservación de alimentos perecederos (escabeches, por ejemplo) y la producción de ácidos en el curso de fermentaciones naturales permite alargar la vida de los alimentos (coles fermentadas, por ejemplo).

Potencial redox: nos indica la capacidad del sustrato para aceptar o donar electrones, esto es: sus características **oxidantes o reductoras**. Uno de los factores que intervienen en el potencial redox, aunque no el único, es la concentración de oxígeno [O₂].

Hay microorganismos que requieren ambientes oxidantes para crecer, mientras que otros necesitan ambientes reductores. El metabolismo de ambos tipos de microorganismos presenta diferencias notables. El requerimiento de condiciones oxidantes o reductoras no debe confundirse con la necesidad de presencia o ausencia de oxígeno para que se produzca el crecimiento.

En general, cuando un microorganismo requiere un ambiente oxidante se dice que desarrolla un **metabolismo oxidativo** (o **respirativo**) mientras que los microorganismos que requieren ambientes reductores (o menos oxidantes) realizan un **metabolismo fermentativo**.

Un **microorganismo es aerobio** cuando necesita oxígeno para vivir y es **anaerobio** cuando o bien no lo necesita (**anaerobios facultativos** como las bacterias entéricas, o como *Saccharomyces cerevisiae*; o **anaerobios aerotolerantes** como las bacterias lácticas) o cuando muere en presencia de oxígeno (**anaerobios estrictos** como los clostridios).

Hay microorganismos que, aunque viven en presencia de oxígeno, no son capaces de utilizarlo como aceptor final de electrones y deben desarrollar un metabolismo fermentativo (los estreptococos, por ejemplo).

Por otra parte, hay microorganismos que pueden desarrollar ambos tipos de metabolismo. Esto es: en presencia de oxígeno desarrollan un metabolismo oxidativo y en su ausencia, fermentativo. El **rendimiento** de los procesos fermentativos es menor que el de los respirativos: las bacterias y las levaduras producen menos biomasa cuando crecen fermentando que cuando lo hacen respirando.

En el curso de ciertas reacciones metabólicas redox se forman **compuestos altamente reactivos** (radicales libres, formas superóxido) que pueden dañar las proteínas, membranas y ácidos nucleicos produciendo la muerte de las células. Las células se defienden de estos compuestos reactivos mediante las enzimas siguientes: **Superóxido dismutasa (SOD)** y **catalasa**. Los anaerobios estrictos carecen de SOD y de **catalasa** o tienen niveles muy bajos de estas enzimas de forma que no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno. La detección de estas enzimas tiene valor taxonómico.

7.- MULTIPLICACIÓN DE LOS VIRUS.

Los virus tienen un ciclo celular diferente al de los microorganismos de vida libre y por consiguiente, su forma de crecimiento y la cinética del proceso es diferente.

Una vez que un virus infecta una célula (fases de **adsorción** y **penetración**) puede comenzar su proceso de multiplicación que requiere la liberación del material genético del virus (**desnudamiento**) síntesis de una serie de enzimas, la multiplicación de su material genético y la síntesis de las proteínas de su cápsida (**síntesis vírica**), el ensamblaje de nuevos viriones (**maduración**) y la **liberación** de estos al exterior. Por consiguiente, desde el ingreso del virión en la célula huésped hasta la liberación de los nuevos viriones producidos como resultado de la infección, transcurre un periodo de tiempo en el que no es posible detectar la presencia de partículas víricas fuera de las células. A este periodo se le denomina **fase de eclipse**. Las fases de eclipse separan liberaciones explosivas de viriones.