Colegio de
San Francisco de Paula

Biotecnología y bioinformática

Opción B

B1. Microbiología: organismos en la industria

Tema 9 de Biología NS

Diploma BI

International Baccalaureate

Idea Fundamental: Los microorganismos se pueden usar y modificar para llevar a cabo procesos industriales.

Relaciones entre los microorganismos y la especie humana

- Al clasificar las relaciones que los microorganismos establecen con la especie humana en concreto, podemos encontrar tres posibilidades:

  - **Inocuas**: Podemos encontrar muchas especies de microroganismos que directamente no se relacionan con la humana, por lo que no le causan ni beneficio ni perjuicio. Sin embargo, como componentes importantísimos de todos los ecosistemas, siempre hay relaciones, aunque indirectas o más difícles de de delimitar. Un ejemplo de ello son los ciclos biogeoquímicos, como el del nitrógeno.

  - **Beneficiosas**: El hombre obtiene gran cantidad de beneficios de muchos microorganismos, utilizándolos para la depuración de aguas residuales, producción de combustibles, técnicas biotecnológicas o producción de alimentos, entre otros.

  - **Perjudiciales**: Hay muchos microorganismos causantes de enfermedades infecciosas y reciben el nombre de patógenos.

Diversidad metabólica de los microorganismos

- Como ya se ha comentado, **los microorganismos se caracterizan por la gran diversidad metabólica que presentan**.
- Así, ocupan un gran número de nichos en los ecosistemas, como los **saprotrofos**, que reciclan la materia orgánica en los ecosistemas al ser quimioheterótrofos. Al ser saprotrofos, las bacterias y los hongos compiten por la misma fuente de alimento, por lo que muchos hongos liberan antibióticos antibacterianos al medio en un esfuerzo por limitar esta competencia interespecífica.

IMAGEN: http://3.bp.blogspot.com

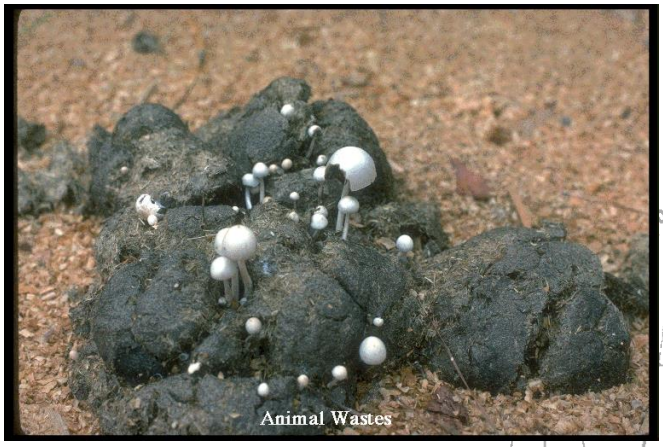


IMAGEN: http://soils.wisc.edu

- Otros microorganismos son **productores**, como las cianobacterias (bacterias fotosintéticas) y las algas, organismos fotoautótrofos que fijan el CO_2 atmosférico.

Diversidad metabólica de los microorganismos

- Otros microorganismos, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* llevan a cabo la **respiración anaerobia** de los glúcidos, produciendo alcohol y CO_2 en una ruta metabólica conocida como **fermentación alcohólica**.
- Por otro lado, bacterias de los géneros *Nitrobacter* y *Nitrosomonas* obtienen energía de la oxidación de compuestos inorgánicos del suelo, para fijar el CO_2 atmosférico, presentando un metabolismo **quimioautótrofo**.
- Los humanos han sido capaces de aprovechar en las aplicaciones biotecnológicas la diversidad de rutas metabólicas presentes en los microorganismos.

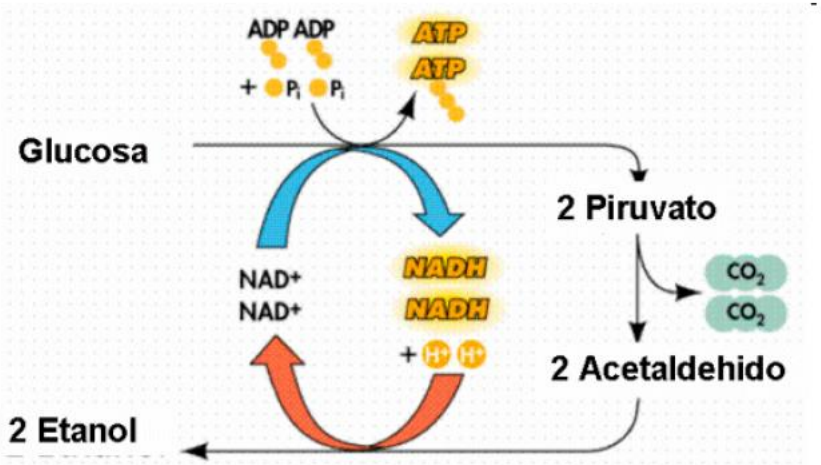


IMAGEN: www2.uah.es

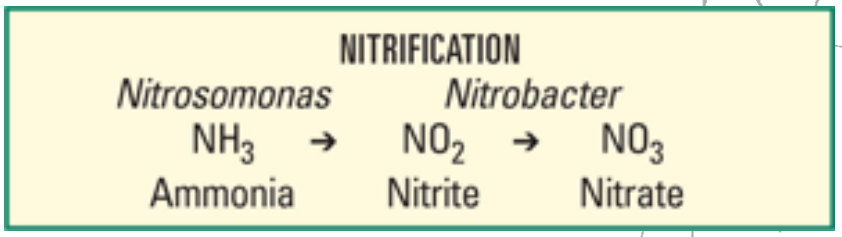


IMAGEN: microbelift.com

Vetajas del uso de microorganismos en la industria

- Los humanos han explotando el metabolismo de los microorganismos a lo largo de la historia, siendo ejemplo de ello, la producción de yogur, pan, vino, cerveza o queso.
- Más recientemente, la biotecnología industrial ha incrementado el número de rutas metabólicas explotadas por el hombre, tanto en la producción de fármacos o combustibles, como en la utilización de microorganismos modificados genéticamente.
- Este auge de la biotecnología industrial se basa en que **muchos microorganismos pueden utilizarse en la industria debido a su pequeño tamaño y a su rápida velocidad de crecimiento**.

IMAGEN: desarrollomultimedia.cl

Ingeniería de rutas metabólicas

- Tradicionalmente, ya fuera mediante cultivo selectivo o por modificación genética, los microorganismos usados en las aplicaciones biotecnológicas eran seleccionados porque eran las variedades que proporcionaban la máxima producción del metabolito deseado.

- Así por ejemplo, se han ido seleccionando aquellas variedades de levadura que producían una mayor concentración de etanol mediante fermentación.
- O bien, se modifican genéticamente las levaduras para que produzcan un menor contenido de productos no requeridos.

Ingeniería de rutas metabólicas

- La ingeniería de rutas metabólicas se distingue de los métodos tradicionales en el uso de un conocimiento detallado y el análisis de las reacciones metabólicas de los sistemas celulares.
- Esto ha permitido a los científicos modificar múltiples puntos de las rutas metabólicas (extender el rango de sustratos, eliminar productos que inhiben el proceso, extender el rango de prodctos, etc.) para mejorar la producción de metabolitos de interés.
- Es por ello por lo que **la ingeniería de rutas metabólicas es utilizada en la industria para producir metabolitos de interés**.

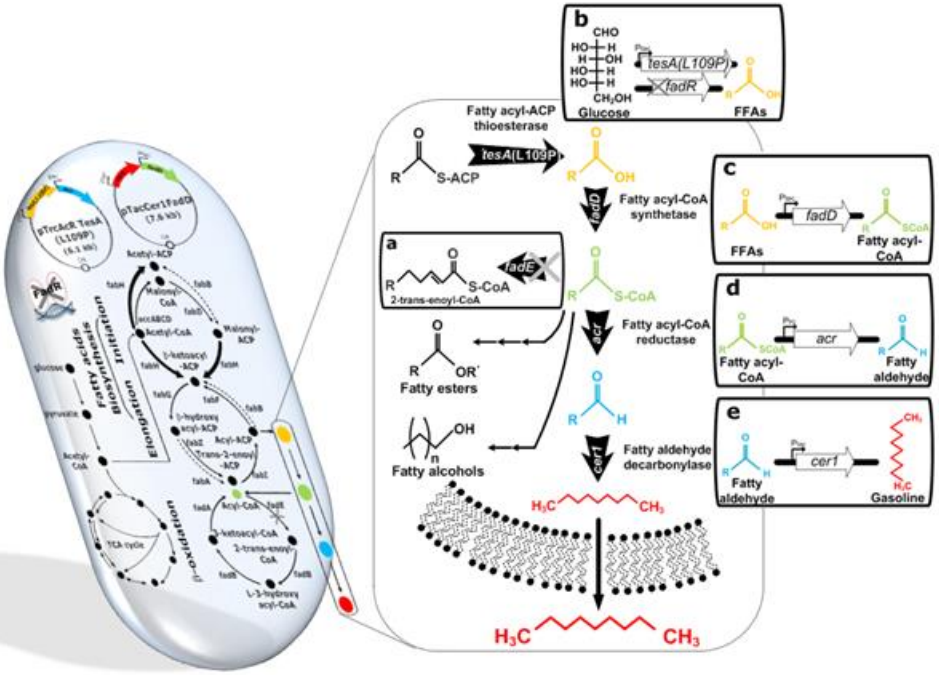


IMAGEN: ydequehablamosahora.files.wordpress.com

Ingeniería de rutas metabólicas

- La ingeniería metabólica es una técnica que analiza las rutas metabólicas de un microorganismo particular con objeto de determinar los puntos "cuellos de botella" de la ruta que limitan la producción del compuesto deseado, y abordarlos medinte modificación genética.

- Un ejemplo se encuentra de nuevo en la producción de vino por la levadura.
- El metabolito malato aparece durante el proceso de formación del vino, y su eliminación mediante trasnformación en otros compuestos, es necesaria para mantener el correcto pH del vino.

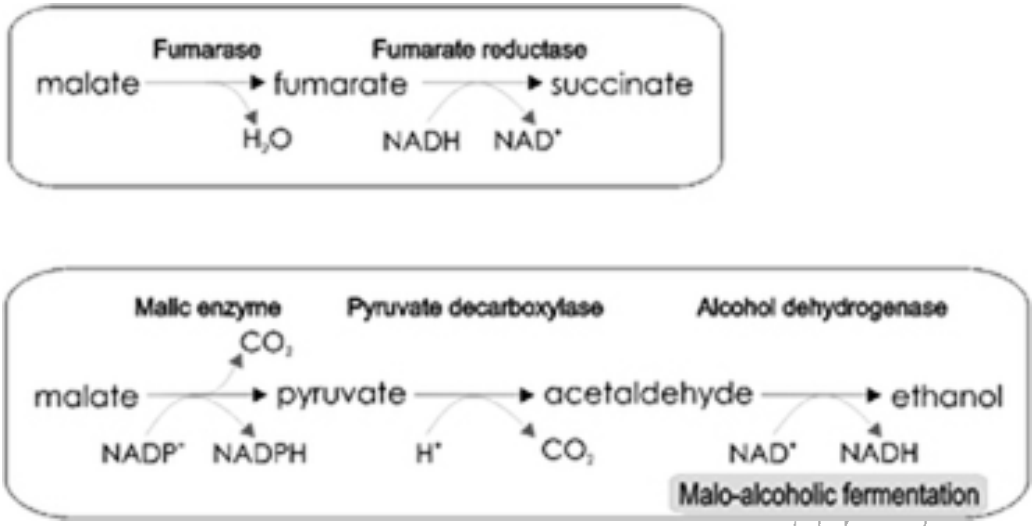


IMAGEN: http://femsre.oxfordjournals.org/content/32/6/974

- Sin embargo, la levadura carece de la proteína que transporta el malato al interior celular (malato permeasa), además de poseer un enzima poco eficiente para su eliminación.

Ingeniería de rutas metabólicas

- El **gen MAE2** codifica para una enzima altamente eficiente en la degradación del malato en *Lactobacillus lactis*, y fue insertado, junto con el gen de la malato permeasa de la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, en la levadura *Saccharomyces cereviciae*.
- Con ello se consiguió de forma exitosa que la levadura *S. cereviciae* llevara a cabo una degradación del malato más eficiente durante la fermentación alcohólica.
- Por tanto, **la ingeniería de rutas metabólicas optimiza los procesos genéticos y regulatorios que tienen lugar en los microorganismos.**

Web1

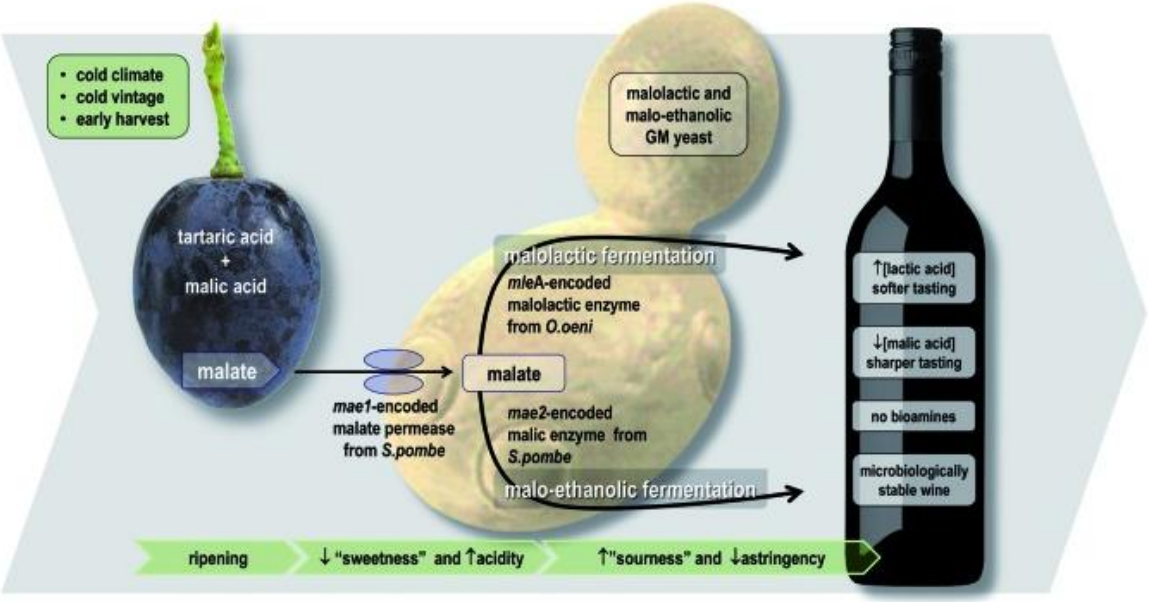


IMAGEN: ydequehablamosahora.files.wordpress.com

Fermentación

- En condiciones **aerobias**, la levadura introduce rápidamente en la mitocondria el piruvato producido en la glucólisis, donde continúa su oxidación para la obtención de ATP.
- Sin embargo, en condiciones **anaerobias** el piruvato permanece en el citosol, siendo transformado en otros productos que serán excretados posteriormente, con la obtención de un poco de ATP.
- Estas reacciones anaerobias se denominan **fermentaciones**, siendo las principales la láctica y la alcohólica.

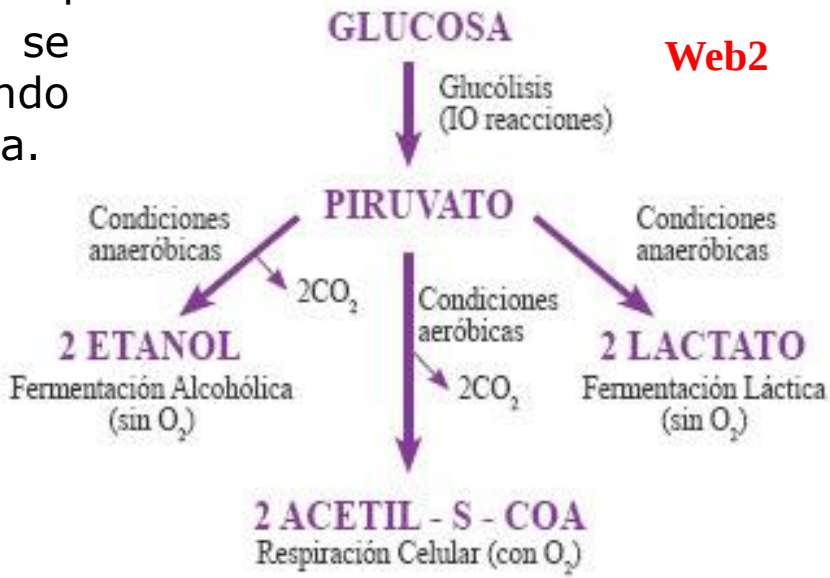


Figura 2. Rutas del piruvato: en células animales el piruvato puede pasar a lactato o a acetil CoA

Fermentación industrial

- Desde un punto de vista biotecnológico, el término fermentación hace referencia a la **producción a gran escala de metabolitos por parte de microorganismos en el interior de fermentadores**.
- Un **fermentador** suele ser un gran contenedor de acero inoxidable lleno de medio nutritivo estéril.
- Dicho medio es inoculado con el microorganismo deseado, y mantenido en agitación mediante aspas para evitar la sedimentación.
- Si el proceso metabólico es aeróbico, se burbujea aire. Un detector de presión monitoriza el aumento de presión y permite la liberación de gases residuales.

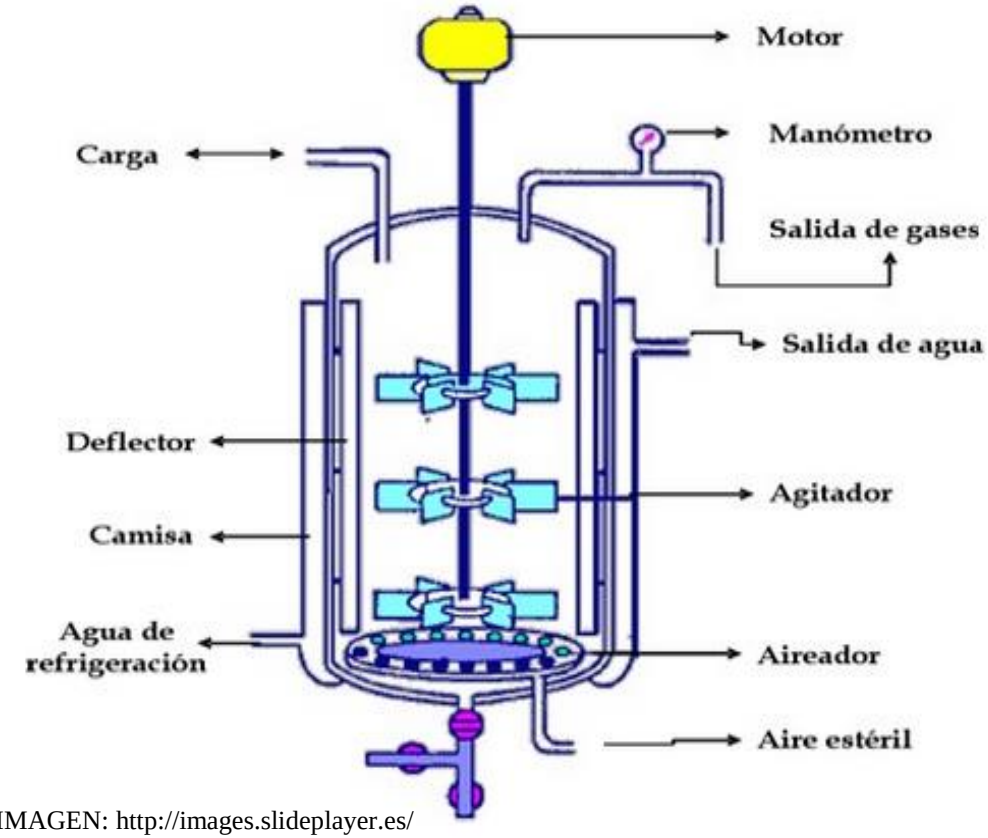


IMAGEN: http://images.slideplayer.es/

Fermentación industrial

- Las condiciones en el fermentador son monitorizadas mediante sensores. Además, suele estar rodeado de una camisa refrigeradora por donde circula agua fría, dado que el calor suele ser un producto de desecho del metabolismo.
- Una vez que el medio ha sido usado, los metabolitos producidos son extraídos y el medio reemplazado por nuevo medio estéril.

Video1

IMAGEN: http://images.slideplayer.es/

Aproximaciones a la fermentación industrial

- Cuando se inocula un medio de cultivo con un microorganismos de interés, comenzará a multiplicarse, aumentando la población.
- Típicamente, el crecimiento de una población sigue una **curva sigmoidal**, donde donde se distinguen 4 fases: Latencia, exponencial, transición-asintótica y muerte.

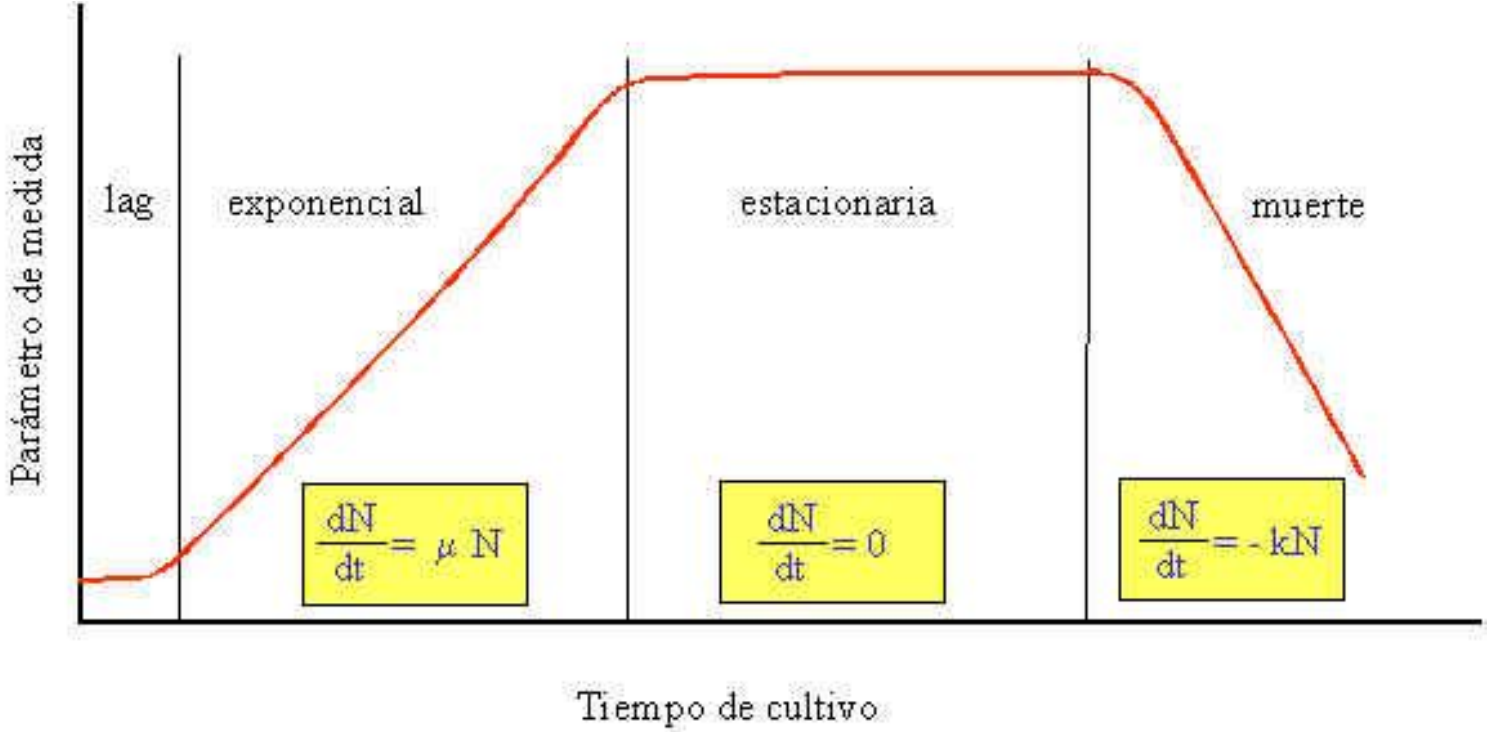


IMAGEN: monografias.com

Aproximaciones a la fermentación industrial

- **La fermentación se lleva a cabo por lotes o mediante un cultivo continuo.**
- La fermentación **por lotes** se lleva a cabo para la producción de metabolitos secundarios, es decir, aquellos que no son necesarios para el crecimiento del microorganismo y aparecen durante la fase estacionaria.
- El cultivo se inicia inoculando el medio estéril con un número adecuado de microorganismos, dejando que se lleve a cabo la fermentación en condiciones óptimas.
- A lo largo del proceso no se le vuelve a añadir ningún nutriente, de manera que llega un momento en el que los nutrientes son limitantes para el crecimiento, apareciendo las fases típicas del crecimiento sigmoideo microbiano.

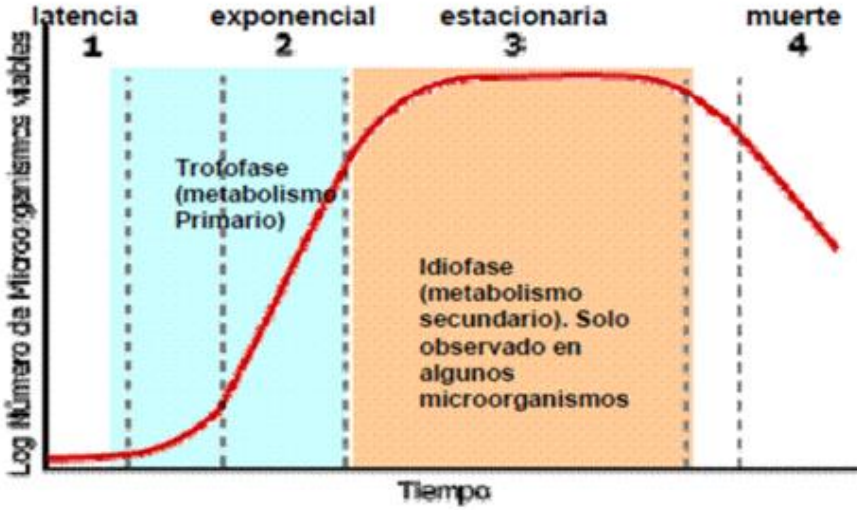
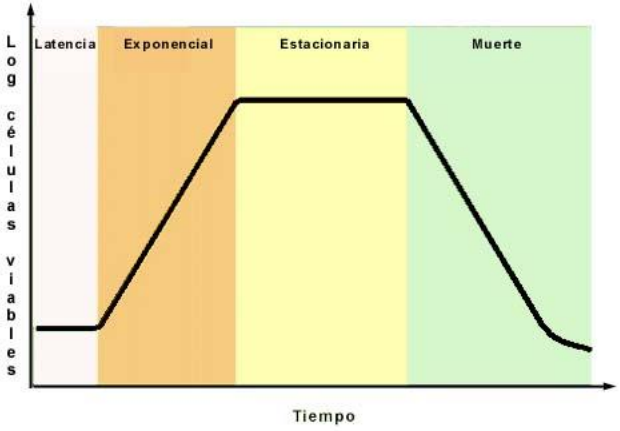


IMAGEN: http://2.bp.blogspot.com

- Se interrumpe el proceso y se recupera el producto (antes de la fase de muerte), se vacía el reactor, se limpia y se comienza de nuevo.

Aproximaciones a la fermentación industrial

- La fermentación **mediante cultivo continuo** se lleva a cabo mediante la adición de nutrientes y la recogida de productos a un ritmo constante durante la fase exponencial de crecimiento.
- Las condiciones son monitorizadas exhaustivamente para mantenerlas constantes, de manera que el proceso pueda continuar durante un largo periodo de tiempo, al mantenerse el crecimiento exponencial del cultivo.



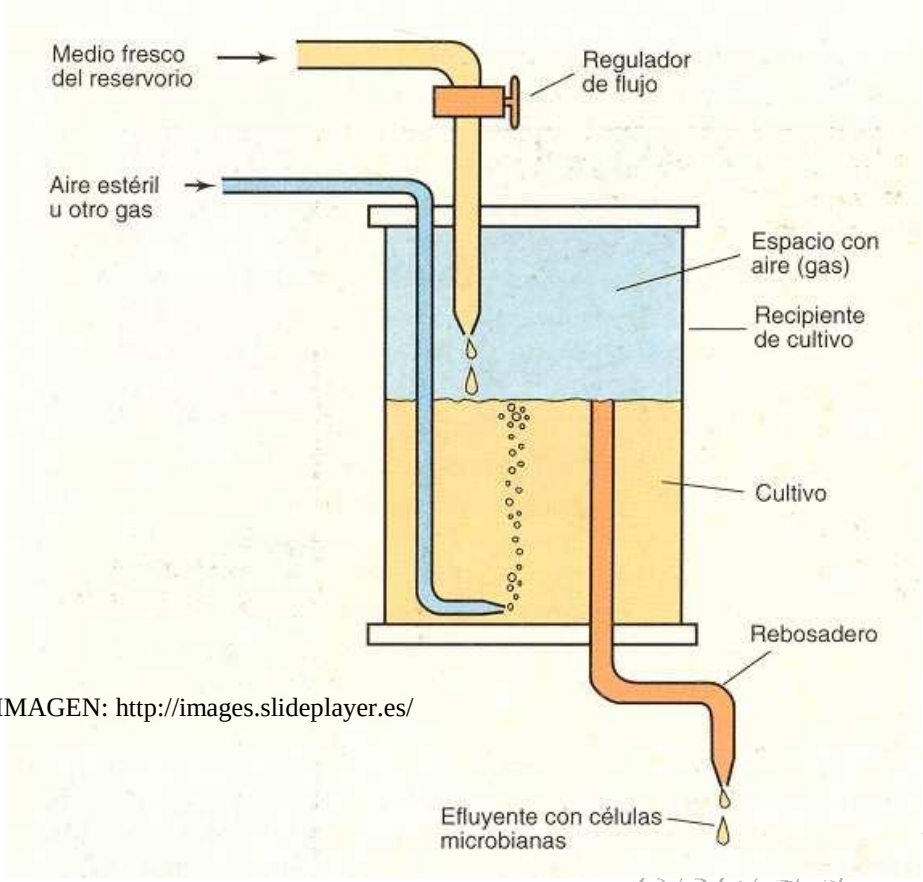


IMAGEN: http://images.slideplayer.es/

Factores limitantes de la fermentación industrial

- Existe un gran número de factores abióticos que limitan la actividad de los microorganismos en los tanques de fermentación, de hecho, **los microorganismos presentes en los fermentadores se ven limitados por sus propios productos de desecho.**
- Algunos de ellos son:

  - La producción de CO_2 puede disminuir el pH, afectando a la actividad enzimática.

  - La producción de gas puede incrementar la presión de gas llegando a afectar a las tasas de reacción.

  - La fermentación alcohólica puede producir tanto alcohol que pudiera tener un efecto osmótico sobre las células.

  - Los niveles de oxígeno pueden agotarse como consecuencia de la respiración celular.

  - El calor producto de desecho de una reacción exotérmica, puede elevar la temperatura en el tanque de fermentación.

Factores limitantes de la fermentación industrial

- Dado que es muy importante que los factores anteriormente expuestos se mantengan dentro de un estrecho margen, con objeto de que no se vea afectada la actividad del microorganismo, **se emplean sondas para controlar las condiciones dentro de los fermentadores**.

IMAGEN: sshemen.com

- Las variables más comúnmente monitorizadas mediante sensores, son el pH, la temperatura, concentración de O_2 y nivel de espuma.

Factores limitantes de la fermentación industrial

- **Las condiciones se mantienen en niveles óptimos para el crecimiento de los microorganismos cultivados.**
- Así, en los cultivos de tipo continuo, las condiciones, tales como el contenido de agua, la temperatura, el pH, concentración de nutrientes y de desechos, densidad celular, concentración de O_2 y CO_2 disueltos, volumen cultivo y otros, deben monitorizarse y mantenerse en unos niveles óptimos para garantizar una productividad constante.
- El nivel óptimo de cada variable depende de cada especie, y muchas veces, el nivel de una variable se encuentra influenciado por el de otra, como ocurre con la concentración de O_2 disuelto, que depende de la temperatura y de la presencia de nutrientes.

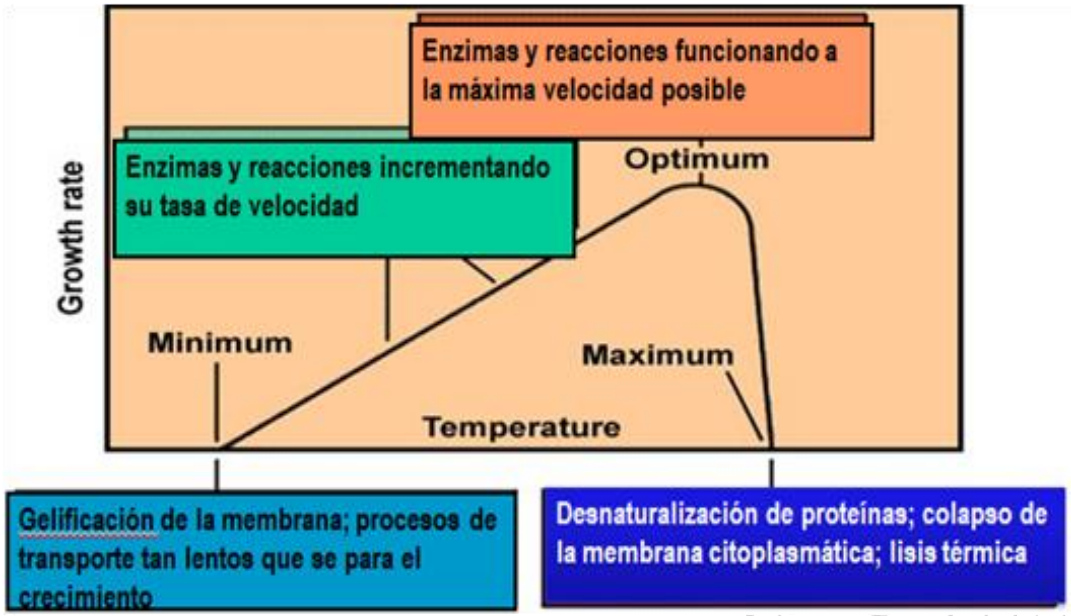


IMAGEN: site.google.com

APLICACIÓN: Producción de penicilina por fermentación

- Los antibióticos son sustancias producidas por seres vivos (antibióticos naturales) o modificadas artificialmente a partir de ellas (antibióticos semisintéticos), que a pequeñas concentraciones tienen efectos antimicrobianos (microbicidas o microbiostáticos).

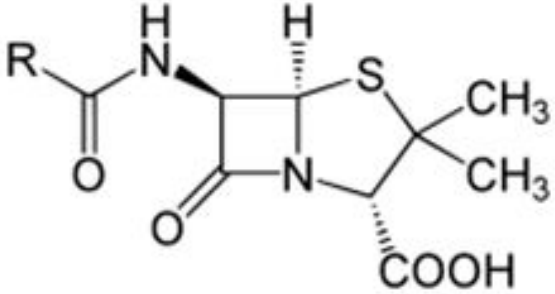
- Su descubrimiento se debe al médico británico **Sir Alexander Fleming** en 1928, cuando por casualidad un hongo del género *Penicillium* contaminó un cultivo bacteriano de *Staphylococcus* en placas de agar y observó que inhibía su crecimiento.

Video2

- Recibió el **premio Nobel de Fisiología o Medicina** en **1945** junto con otros dos investigadores por crear un método para producirlo en masa, constituyendo el primer hito en la lucha contra las enfermedades infecciosas.

APLICACIÓN: Producción de penicilina por fermentación

- Los ensayos iniciales con *Penicillium notatum* no producían la cantidad suficiente como para atender la demanda de antibióticos que los heridos de la 2ª Guerra Mundial requerían.
- La producción a gran escala de penicilina se consiguió gracias a la **fermentación por lotes en taques profundos**.
- Esta fermetación presentaba tanto una fuente de oxígeno burbujeado en el tanque, como unas palas que lo distribuían uniformemente.
- La fuente nutritiva para el hongo es el licor de maíz, producido tras calendar una cuba de maíz a 50 ºC durante dos días.



Web3

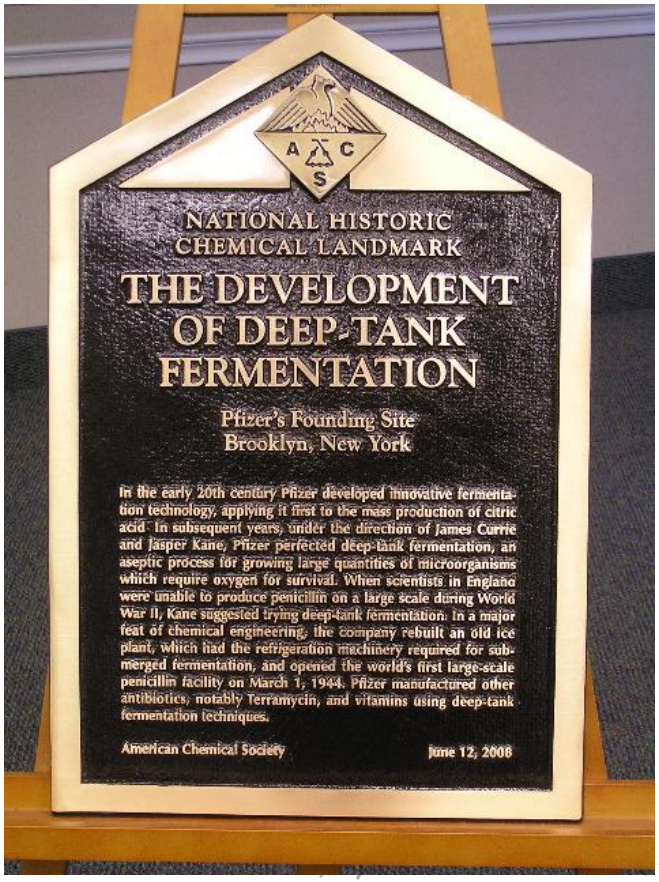
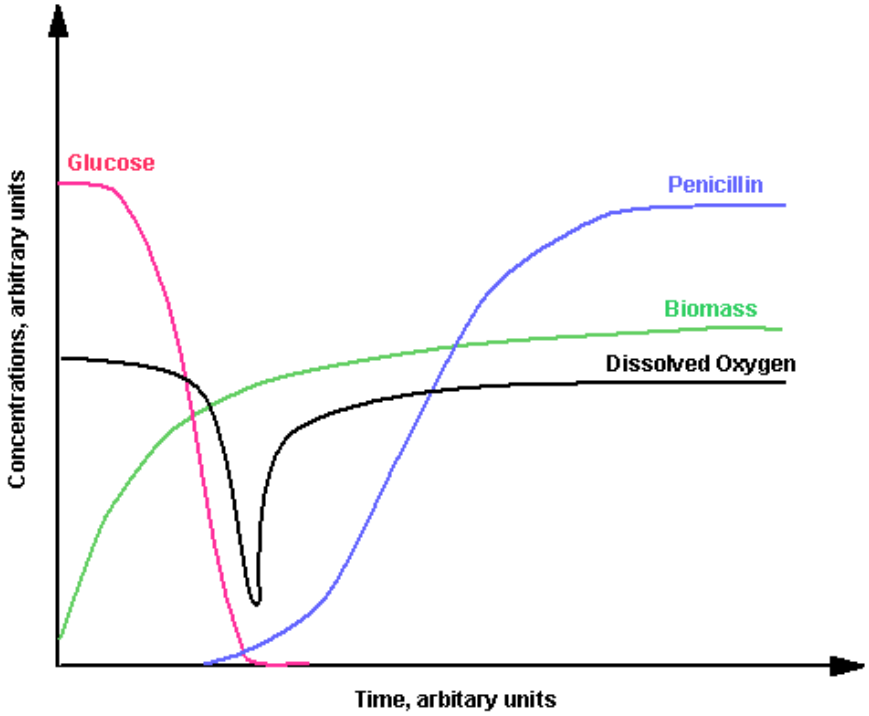


IMAGEN: http://www.newyorkacs.org

APLICACIÓN: Producción de penicilina por fermentación

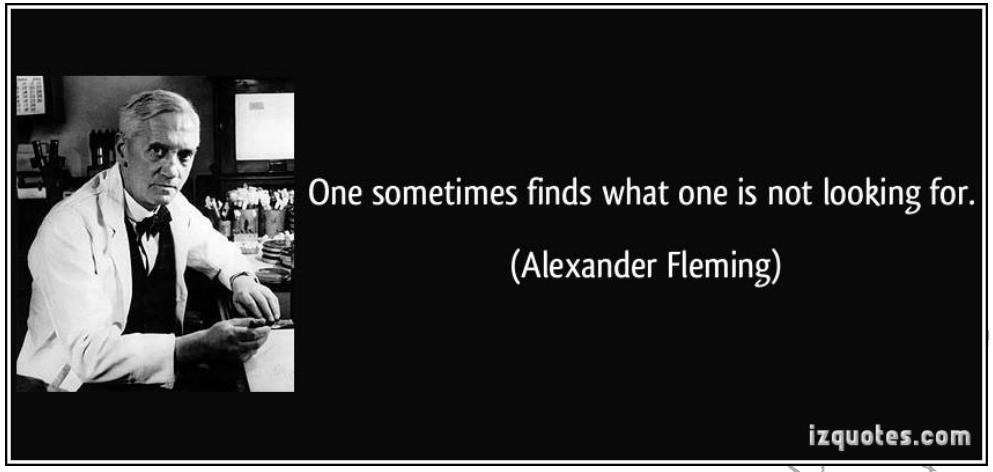
- Los **antibióticos son metabolitos secundarios**, y como tales, se producen en un determinado momento del ciclo de vida del microorganismo (fase estacionaria) y bajo ciertas condiciones concretas.
- Así, la producción de penicilina tiene lugar a 24 ºC, pH ligeramente básico y con un buen aporte de oxígeno.



- La penicilina comienza a producirse unas 30 h después de que haya comenzado el cultivo y el nivel de nutrientes comience a declinar, manteniéndose su producción a lo largo de 6 días.
- El líquido extraído del cultivo es filtrado para a partir de él obtener el antibiótico cristalizado.

Descubrimiento de penicilina y TdC

- Como se ha comentado, el descubrimiento de la penicilina se debió al médico escocés **Sir Alexander Fleming**, cuando en septiembre de 1928 regresó de unas largas vacaciones y observó que en una placa de petri que iba a desechar conteniendo colonias de *Staphylococcus*, había un área libre de la bacteria debido al crecimiento de un hongo que había inhibido el crecimiento bacteriano.
- Fleming identificó al hongo contaminante como una cepa del género *Penicillium* y encontró que mataba a las bacterias Gram-positivas, incluyendo aquellas causantes de la fiebre escarlata, pneunomía, gonorra , meningitis y difteria.



Web4

- **¿En qué medida fue el descubrimiento del Dr. Fleming una observación afortunada? ¿O solo percibimos únicamente aquello para lo cual estamos abiertos?**

HABILIDAD: Zonas de inhibición en placas de Petri

- Las bacterias pueden ser cultivadas en condiciones controladas de laboratorio. Para ello, se usa un medio nutritivo con agar, que hace de espesante para que el medio solidifique y pueda verterse en una placa de Petri.
- Las bacterias individuales de dividen y forman **colonias**, pero también uno puede sembrar una placa entera con una misma bacteria, obteniendo un **césped bacteriano**.

IMAGEN: apsnet.org

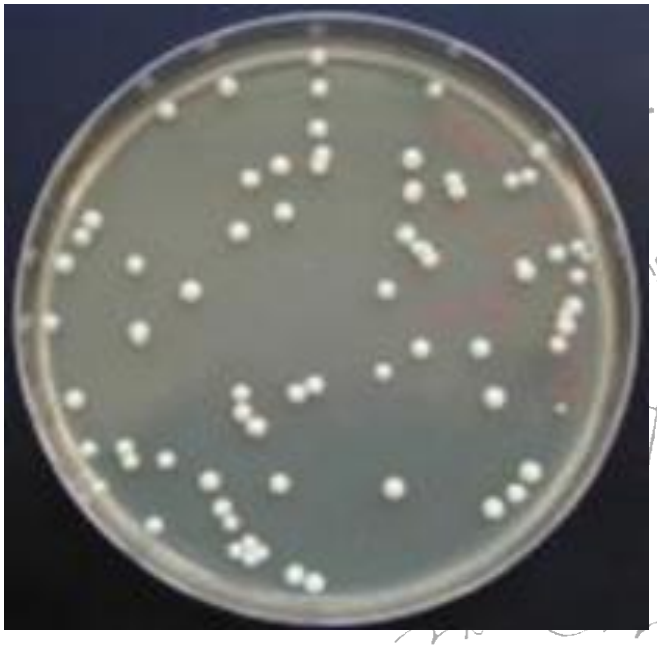


IMAGEN: quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

HABILIDAD: Zonas de inhibición en placas de Petri

- Lo que Fleming observó fue una **zona de inhibición**, una zona del césped con morfología circular donde se inhibe el crecimiento bacteriano debido a una sustancia antibacteriana. El diámetro de la zona de inhibición es una medida de la fuerza del agente antibacteriano.
- Un **antibiograma** es una prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos a partir del diámetro de las zonas de inhibición.
- Para su realización se humedecen discos de papel de filtro en los distintos antibióticos y se colocan sobre una placa de Petri donde previamente se ha extendido un cultivo bacteriano.

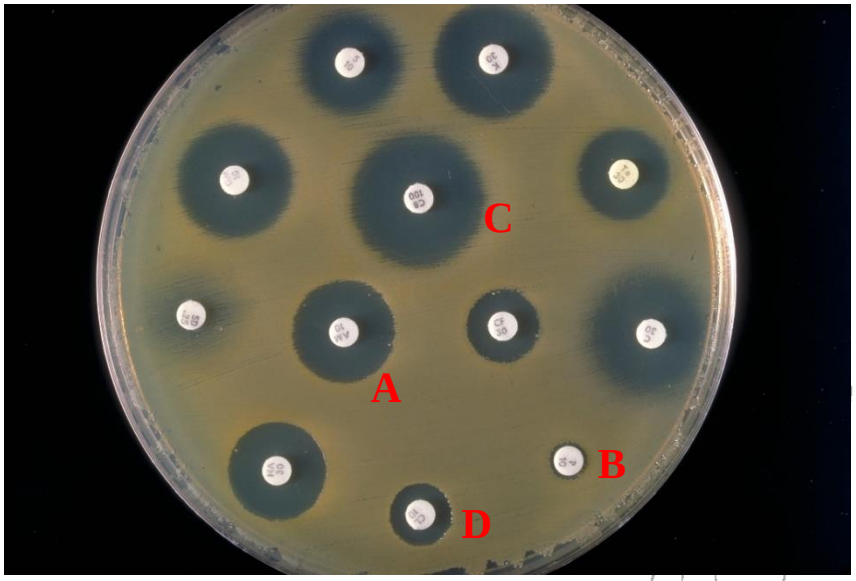


IMAGEN: upload.wikimedia.org/

Actividad1

- Según el antibiograma de la imagen, ¿a qué antibiótico es más y menos sensible la bacteria?

NATURALEZA CIENCIAS: Serendipia

- La serendipia (descubrimiento o hallazgo afortunado e inesperado) ha conducido a descubrimientos científicos, como el de la penicilina por parte de Fleming, que puede considerarse un suceso azaroso.
- Sin embargo, una característica diferencia la serendipia de la mera casualidad, y es la presencia de una mente preparada.
- El Dr. Fleming fue lo bastante brillante como para conectar una observación inesperada con sus estduios previos sobre agentes antibacterianos.
- Al igual que con la penicilina, la serendipia ha estado detrás del descubrimiento de muchos fármacos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, como la piperezina para los gusanos intestinales, y no infecciosas, como el viagra para los problemas de erección.

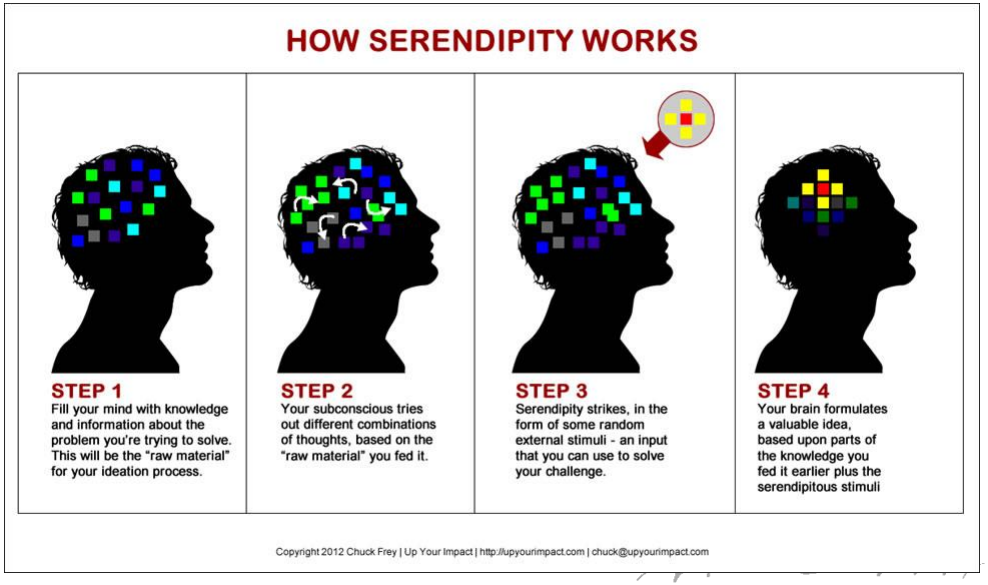


IMAGEN: http://edinburghbiosciences.com

APLICACIÓN: Producción industrial de ácido cítrico

- El ácido cítrico es un ácido orgánico débil usado como aditivo alimentario, tanto como aromatizante como conservante, cuya producción industrial se realiza en un **fermentador continuo mediante *Aspergillus niger*.**
- Como el ácido cítrico es producido en el ciclo de Krebs, se considera un metabolito primario.

IMAGEN: iquimicas.com

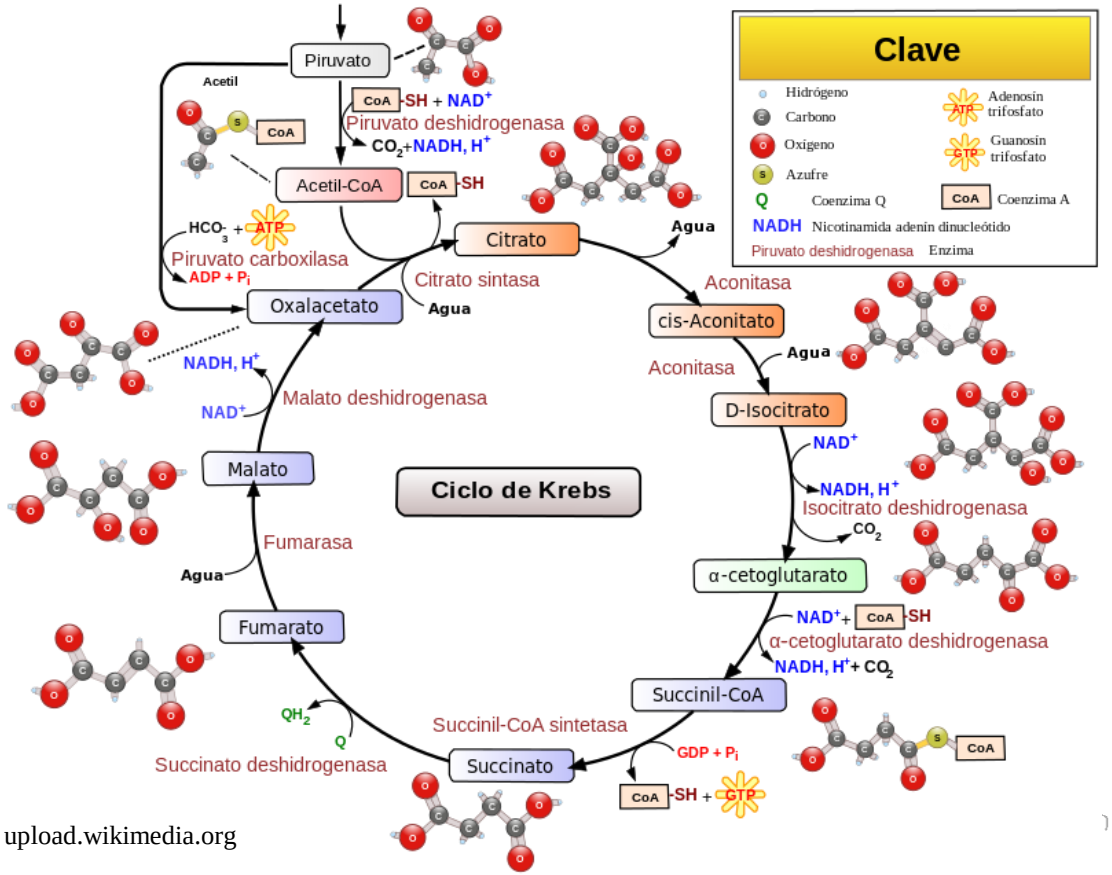
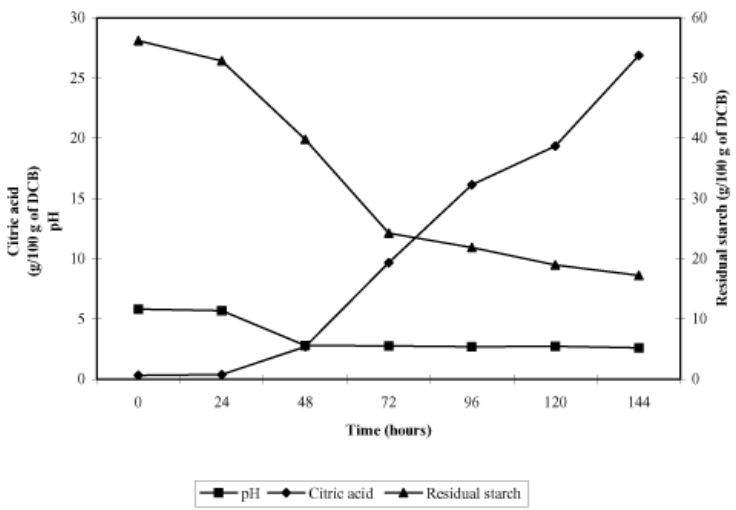
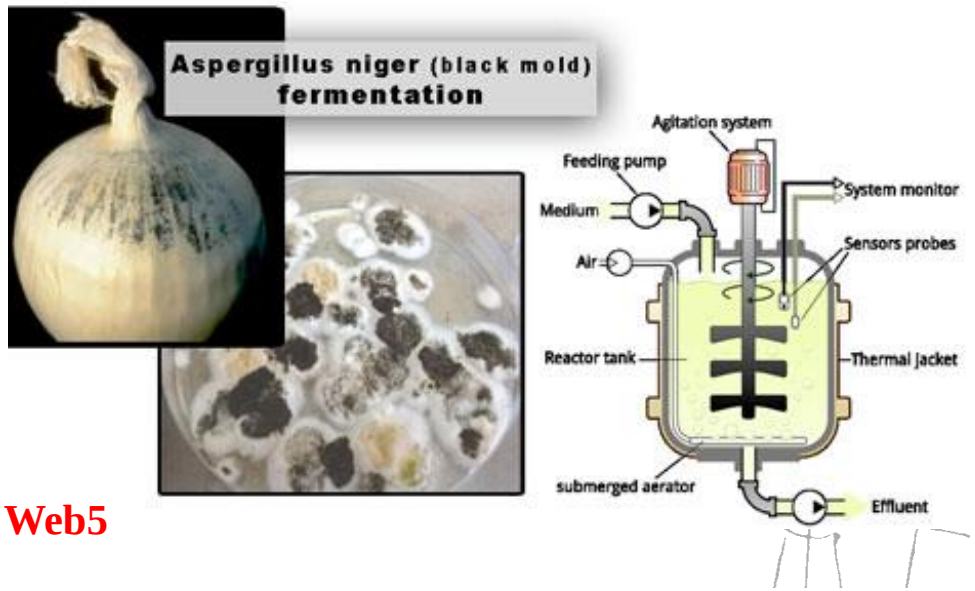


IMAGEN: upload.wikimedia.org

APLICACIÓN: Producción industrial de ácido cítrico

- Las condiciones óptimas para la producción de ácido cítrico son una alta concentración de oxígeno disuelto, alta concentración de azúcares, pH ácido, una temperatura de 30 ºC, y la presencia de ciertos minerales, como el hierro.





Web5

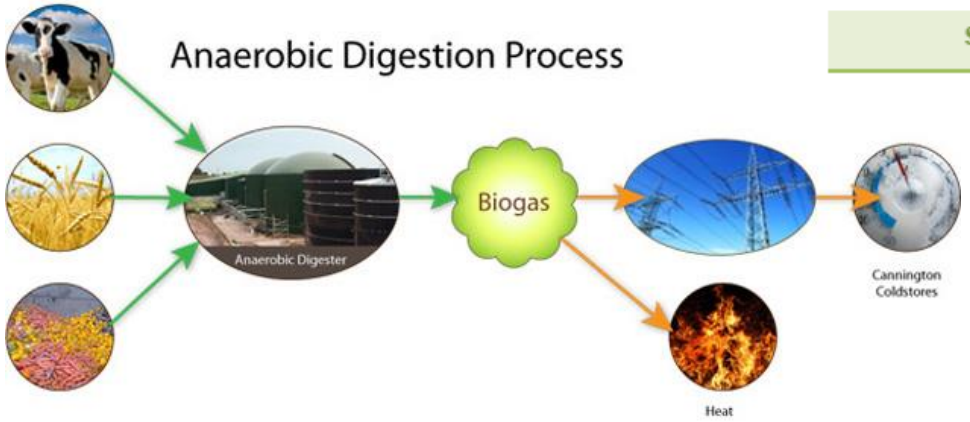
- El medio de cultivo se filtra, y al filtrado se le añade $Ca(OH)_2$, precipitando en forma de citrato de calcio sólido. El ácido cítrico es obtenido mediante tratamiento químico posterior de dicha sal.

APLICACIÓN: Producción de biogás por arqueobacterias

- La generación de metano o **metanogénesis**, consiste en la digestión anaerobia de distintos tipos de desechos orgánicos animales (estiércol), vegetales (restos cultivos) o urbanos.
- El metano producido se denomina **biogás**, compuesto de metano (60-70%) y CO_2 (30-40%).

COMPOSICIÓN MEDIA DEL BIOGÁS

COMPONENTE	%
Metano	54-74
CO2	27-45
Nitrógeno	0.3-3
Hidrógeno	1-10
Monóxido de carbono	0.1
Oxígeno	0.1
Sulfuro de Hidrógeno	trazas



- **El biogás se produce en fermentadores mediante bacterias y arqueobacterias a partir de materia orgánica.**

APLICACIÓN: Producción de biogás por arqueobacterias

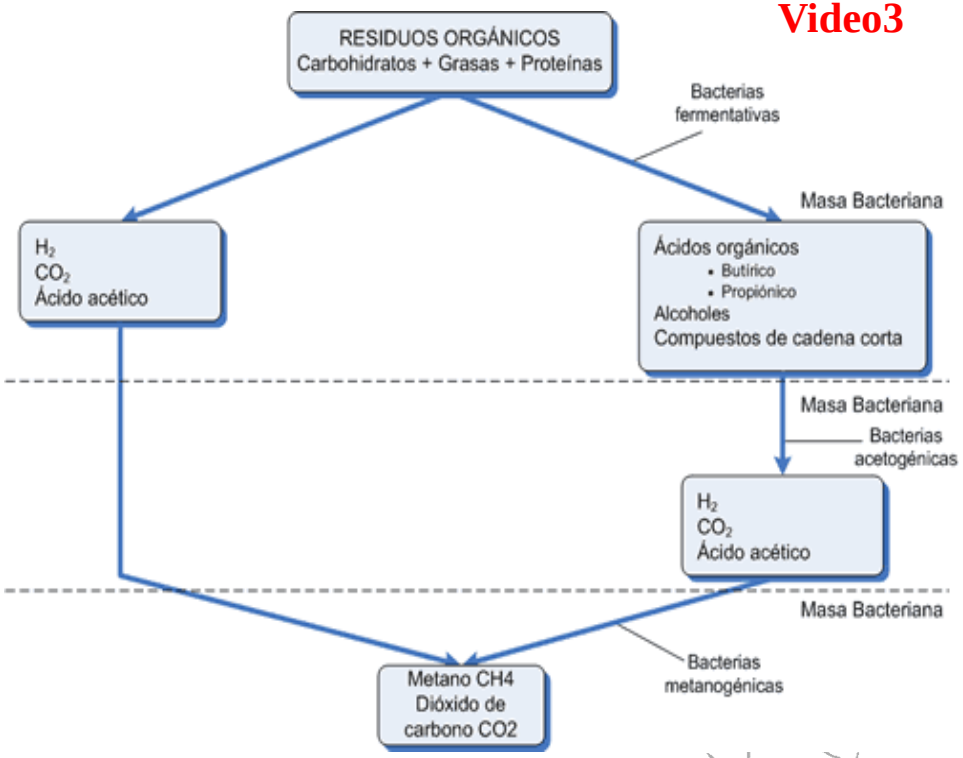
- Para completar el proceso de metanogénesis, se precisan tres grupos de bacterias en un **fermentador** en **condiciones anaerobias**:

  -Un primer grupo de bacterias **acidogénicas** para digerir los residuos orgánicos hasta ácidos orgánicos y alcohol.

  -Un segundo grupo de bacterias **acetogénicas** para convertir estos ácidos orgánicos y el alcohol en acetato, CO_2 y H_2.

  -Por último, arqueobacterias **metanogénicas** para generar el metano, bien mediante la reducción del CO_2 con el H_2 o por descomposición del acetato.

Video3



APLICACIÓN: Producción de biogás por arqueobacterias

- Los dos primeros grupos de bacterias implicadas (acidogénicas y acetogénicas) son eubacterias, mientras que el tercer grupo son arqueobacterias (metanogénicas).
- Las arqueobacterias producen metano de dos formas distintas:

  - Reducción del dióxido de carbono a metano.

$$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$$

  - Descomposición del acetato a metano y dióxido de carbono.

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$$

- Ciertas condiciones deben mantenerse constantes en el fermentador:

  - Ausencia de oxígeno.
  - Temperatura constante de 35 ºC para prevenir un amento de la misma que perjudique a las bacterias.
  - pH no ácido.

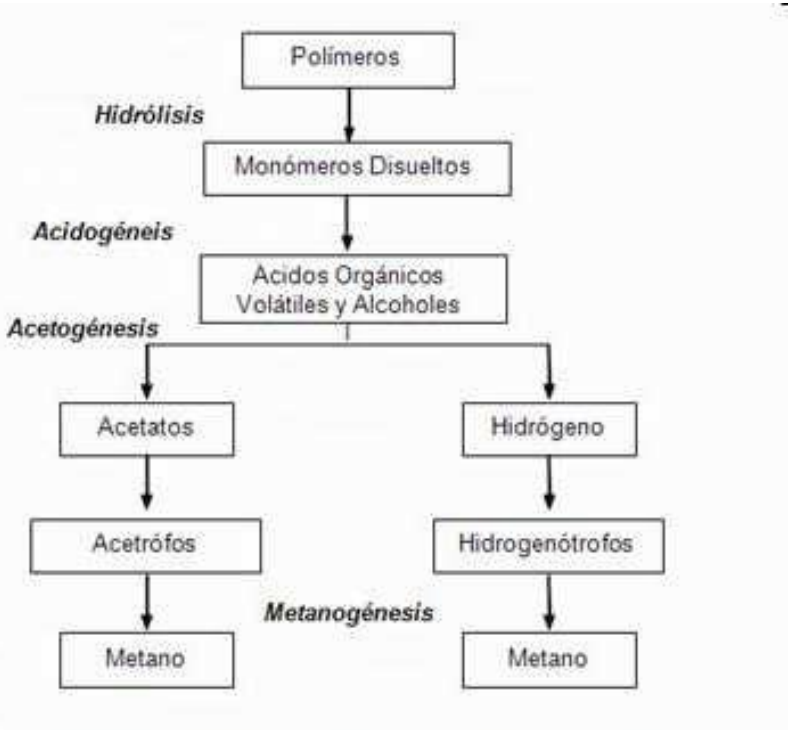


Figura 7. Esquema simplificado de las etapas metabólicas de la anaerobiosis.

HABILIDAD: Producción de biogas a pequeña escala

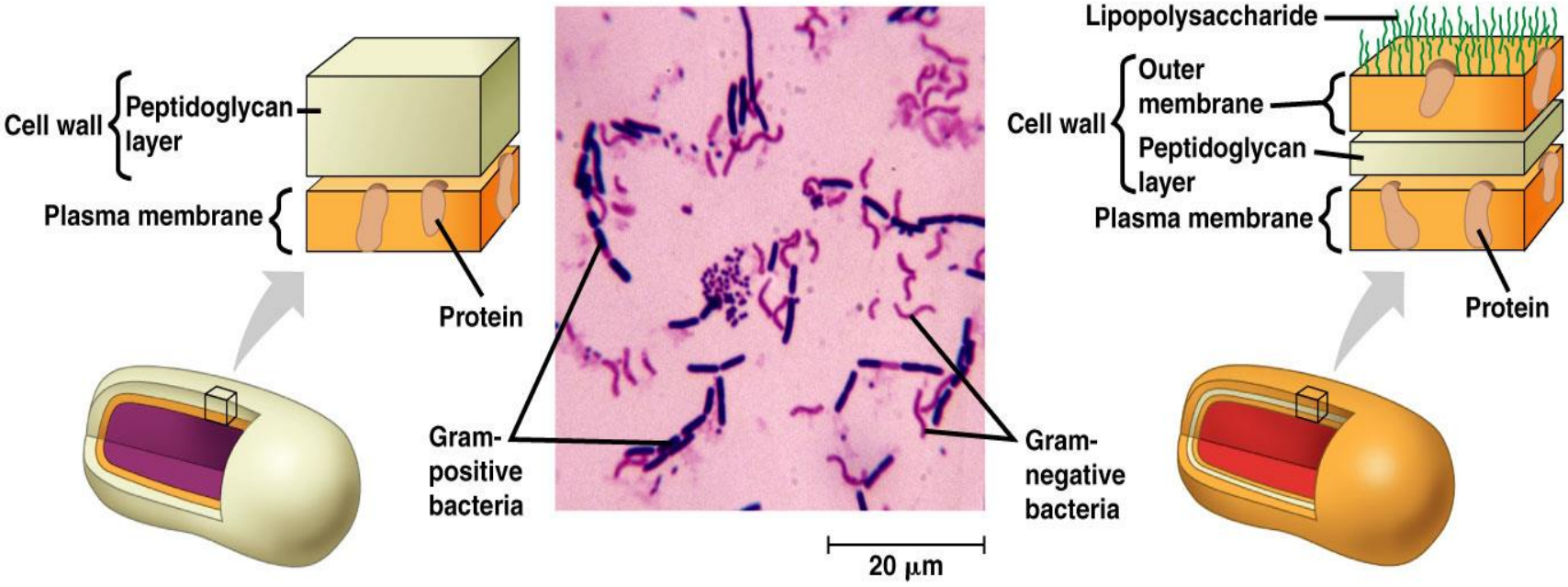
- Se puede construir fácilmente un fermentador casero a pequeña a escala, para la producción de biogás.
- Dicho fermentador puede realizarse con una botella de plástico de 2 litros, un embudo, cinta o silicona, un tubo de manguera, un globo (mejor no de látex) y restos de materia orgánica (excrementos animales, hojarasca, restos de comida, etc.).
- ¿Te atreves a hacer el tuyo?

IMAGEN: monografías.com

IMAGEN: biotec8.blogspot.com.es

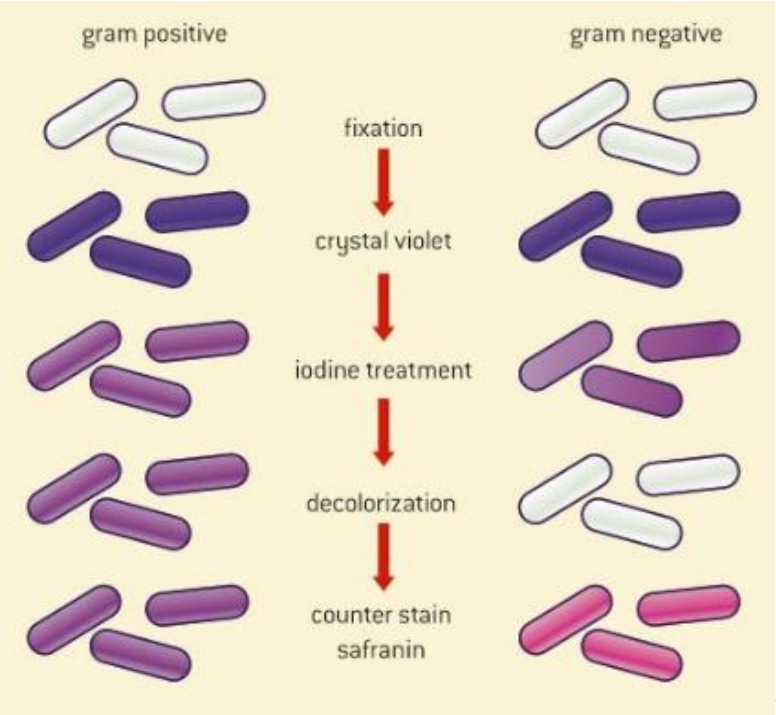
HABILIDAD: Tinción de Gram

- Un método usado para la identificación de las eubacterias se basa en la estructura de su pared celular, pudiéndose distinguir dos grupos en función de la tinción ideada por el médico danés Hans Christian **Gram**: Gram + (púrpura) y Gram - (rosa).



(a) Gram-positive (b) Gram-negative

Copyright © 2005 Pearson Education, Inc. Publishing as Pearson Benjamin Cummings. All rights reserved.

HABILIDAD: Tinción de Gram

- Las bacterias son fijadas al portaobjeto por el calor una llama.
- El colorante **cristal violeta** penetra en todas las células bacterianas (tanto gram positivas como gram negativas) a través de la pared bacteriana. Por otro lado, el **lugol** actúa como mordiente, haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad a la pared de la célula bacteriana.
- Se añade una mezcla de **alcohol-acetona** para realizar la decoloración, ya que en la misma es soluble el complejo I_2/cristal violeta.
- Los organismos gram positivos no se decoloran, mientras que los gram negativos sí. Para poner de manifiesto las células gram negativas se utiliza un colorante de contraste, como la **safranina** (rojo).
- Después de la coloración de contraste las células gram negativas son rojas, mientras que las gram positivas permanecen violetas.