

¿Cómo estudiamos los microbios?

Oye, el pastel que guardé de la semana pasada está cubierto de manchas de diferentes formas y colores. ¿Son microbios? ¿Cómo podemos analizarlos?



Fernando Rojo¹, Renata Moreno¹, Olga Zafra²

¹Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid, España, y²Universidad Francisco de Vitoria, Facultad de Ciencias Experimentales, Pozuelo de Alarcón, Madrid, España

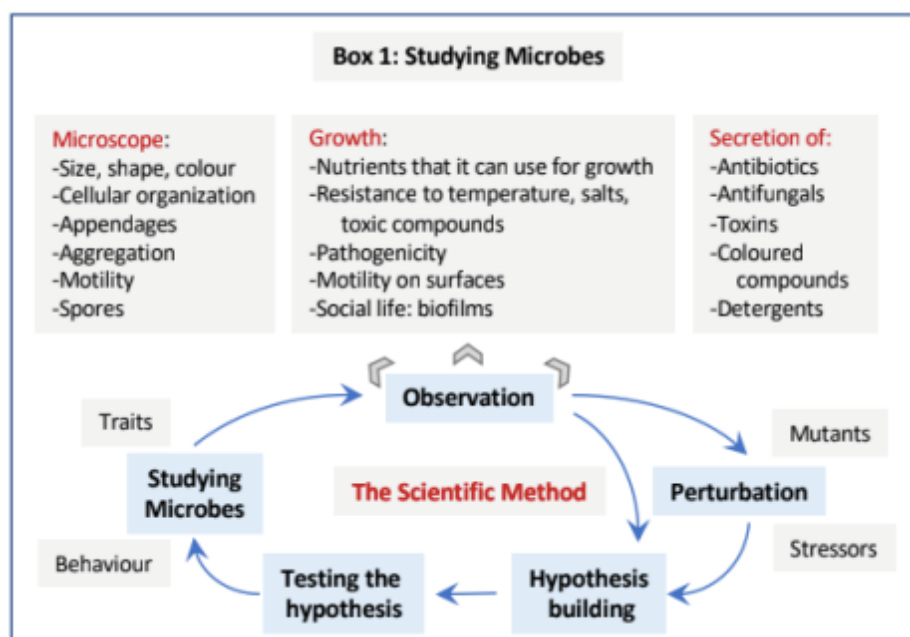
Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

Sinopsis

La vida cotidiana nos proporciona abundantes pruebas de que los microbios viven a nuestro alrededor, incluso sobre nosotros, pero sólo en ocasiones nos damos cuenta de su presencia, como cuando los alimentos se estropean (aunque estén guardados en el refrigerador), cuando la carne adquiere un brillo fluorescente en la superficie o cuando las botellas transparentes que contienen agua desarrollan una película verde en la pared interior. Pero ¿cómo sabemos que los microbios son los culpables? ¿Cómo pueden crecer en esas condiciones? ¿Podemos reproducir su crecimiento en el laboratorio? ¿Y cómo podemos estudiar sus propiedades?

¿Cómo estudiamos los microbios?

1. *El enfoque científico de un gran problema (¡los microbios no son tan fáciles de estudiar!).* Si nosotros sospechamos que los microbios están contaminando nuestra comida o creciendo en nuestra botella, el primer paso para comprobar si estamos en lo cierto es hacer observaciones cuidadosas. Más tarde podemos intentar cultivar los microorganismos contaminantes. Sin embargo, nada de esto es sencillo. Los microbios suelen ser muy pequeños (normalmente de unos pocos micrómetros), lo que significa que necesitamos un buen microscopio para verlos. Esto se complica aún más por el hecho de que es difícil saber exactamente qué estamos viendo cuando los encontramos; existen muchos microbios diferentes y muchos de ellos parecen muy similares. Cultivar microbios también puede ser complicado, ya que rara vez crecen de forma aislada; más bien, tienden a formar comunidades compuestas de diferentes especies cuyos miembros interactúan e incluso pueden depender unos de otros para crecer. ¿Podemos aislarlos? ¿Cómo podemos identificar los tipos de microbios de estas comunidades y estudiarlos por nuestra cuenta? En realidad, no podemos saberlo con antelación. Tenemos que proceder paso a paso, primero observando, luego formulando hipótesis y, por último, diseñando experimentos para comprobar si nuestras hipótesis son correctas. *Ese es el método científico*, es la forma en que los científicos abordan los problemas.



Microscopio – Tamaño, forma, color., Organización celular., Apéndices., Agregación., Motilidad.,

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

Esporas. **Crecimiento** – Nutrientes que pueden utilizar para crecer., Resistencia a la temperatura, sales, compuestos tóxicos., Patogenicidad., Motilidad en superficies., Vida social: biopelículas. **Secreción de** – Antibióticos., Antifúngicos., Toxinas., Compuestos coloreados., Detergentes

El Método Científico: Observación – Perturbación (Mutantes; Factores de estrés) – Elaboración de hipótesis – Comprobación de la hipótesis – Estudio de los microbios (Rasgos; Comportamiento)

2. Planificación de un experimento adecuadamente diseñado. Cuando queremos analizar un microbio o una comunidad microbiana, debemos tener en cuenta algunas cosas:

- a. *La complejidad de la muestra* ¿Contiene sólo un tipo de microbio (este puede ser el caso de algunas muestras clínicas, como la sangre, que normalmente no contienen microbios excepto durante una infección), o muchas especies microbianas diferentes que juntas forman una comunidad (el caso habitual)?
- b. *¿Es posible cultivar estos microbios en medios de laboratorio? ¿Es posible reproducir las condiciones ambientales en las que viven normalmente? ¿Es posible obtener cultivos puros de las distintas especies?* A veces nada de esto es posible, lo que determina el tipo de análisis que debemos realizar.
- c. *¿Cuántos detalles necesitamos?* ¿Queremos simplemente saber qué microbios existen y cómo se comportan, o queremos ir más allá y entender cómo y por qué se comportan como lo hacen?

Como regla general, si un problema es muy complejo, es decir, si tiene muchos componentes y/o variables, podemos abordarlo de una manera *reduccionista*. Para ello, dividimos el problema en partes más pequeñas e intentamos resolver cada una de ellas antes de reunir las soluciones individuales para resolver (esperamos) el problema original más amplio.

En nuestro trabajo debemos recordar siempre un *aspecto clave* de la ciencia experimental: *reproducibilidad*. Una sola medición u observación es un buen comienzo, pero rara vez proporciona certeza. La certeza se deriva de la reproducibilidad: si se repite un experimento varias veces y el resultado es siempre el mismo, se puede tener confianza en ese resultado. Si los resultados individuales son similares, pero no idénticos, el grado de confianza que podemos permitirnos en ellos debe determinarse mediante cálculos estadísticos. Cuanto mayor sea la similitud entre las réplicas, mayor será la confianza que podemos tener. Pero ¿qué nivel de confianza es aceptable? Eso depende del problema al que se enfrenta y de cuán seguros realmente necesitamos estar.

También debemos recordar los “controles”, otro *elemento clave* de experimentación. Los controles son muestras de composición o comportamiento *conocido* que se analizan en paralelo con muestras del *problema*. Nos indican si la técnica que se está utilizando funciona correctamente o, al menos, su grado de precisión. Las técnicas analíticas que proporcionan resultados precisos son, por supuesto, muy importantes, pero también lo es el procesamiento y la interpretación adecuados de los datos recopilados. Siempre es posible que se produzcan interpretaciones erróneas que nos lleven por el camino equivocado.

3. Comenzamos nuestro análisis. Primero observamos los microbios, luego los perturbamos y vemos cómo reaccionan. La OBSERVACIÓN es el primer paso para analizar cualquier microbio o comunidad microbiana. Observar a los microbios, seguir su comportamiento, intentar aprender algo sobre su hábitat y su crecimiento. Realizar mediciones de variables que puedan ser importantes (la temperatura, la humedad, la concentración de sales, etc.) nos dará una idea de la complejidad del problema. A continuación, podremos formular nuestras primeras hipótesis y diseñar los primeros experimentos que las pondrán a prueba y nos proporcionarán más información. Los resultados de nuestros primeros ensayos pueden validar nuestras hipótesis, obligarnos a modificarlas o incluso rechazarlas.

Cuando se completan las primeras rondas de observación/hipótesis/validación, es hora de dar el siguiente paso: PERTURBACIÓN. La perturbación se utiliza para obtener información sobre cómo

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

reacciona algo a la perturbación y puede proporcionar información sobre cómo funciona. (Por ejemplo, si alguien te pincha en el brazo, ¿le devuelves el pinchazo o te alejas? Esta perturbación proporciona información sobre tus respuestas conductuales). Puedes perturbar el ecosistema, el hábitat o el propio microbio para probar tu hipótesis sobre cómo funciona todo. Puedes cambiar la temperatura de crecimiento, la composición del medio de crecimiento, añadir compuestos como antibióticos o, si es posible, alterar el contenido genético del microbio en estudio, inactivando genes particulares, lo que hace que el microbio se vuelva mutante (crear mutantes no siempre funciona porque algunos genes son prescindibles o parcialmente prescindibles, pero otros son esenciales y no se pueden inactivar). Los resultados que obtenga en esta y otras rondas del mismo experimento validarán sus hipótesis o le indicarán que las rechace o las refine, lo que le permitirá comprender mejor el microbio o la comunidad microbiana que le interesa.

A continuación, se presentan algunos ejemplos que ilustran cómo abordar este tipo de análisis. Algunos se basan en la observación del microbio o su entorno. Otros se centran más en la perturbación y en observar cómo responden las cosas.

4. **Características clave de los microbios: cómo estudiarlos.** Existen muchos tipos de microbios. Pueden variar enormemente en tamaño, complejidad, estilo de vida, requerimientos nutricionales y capacidad de adaptarse a diferentes ambientes, diferentes temperaturas, etc. Las siguientes líneas discuten algunas de las características clave que necesitaremos conocer.

a. Complejidad. Los microbios suelen ser unicelulares, pero pueden ser bastante complejo. Todas las formas de vida conocidas pueden agruparse en uno de los tres grandes Dominios de la Vida: el *Bacteria*, *Arqueas* o *Eucariota* (Los virus son un caso especial que no encaja en este esquema). En los miembros de *Eucariota* (conocidos como eucariotas), el genoma está encerrado dentro de una membrana, formando el núcleo. *Bacteria* y *Arqueas*, el genoma no está encerrado en una membrana; no hay núcleo definido. Estos organismos se denominan procariotas. Todos los animales y plantas son eucariotas, pero los microbios pueden ser procariotas o eucariotas. Los microbios eucariotas incluyen hongos como levaduras, algas unicelulares y protozoos. Los procariotas incluyen todas las bacterias conocidas, así como las arqueas; las arqueas son unicelulares y comparten algunas propiedades tanto de las bacterias como de los eucariotas. Una muy buena forma de comenzar a estudiar un microbio es determinar si es un eucariota o un procariota. Las células eucariotas suelen ser más grandes que las células procariotas y se pueden ver fácilmente con el microscopio óptico. También tienen "orgánulos" característicos en su interior que están ausentes en las células procariotas (aunque algunas bacterias tienen estructuras similares a los orgánulos; *¡En la biología siempre existen excepciones!*). Algunos genes son marcadores útiles para saber si un microbio es un eucariota, una arquea o una bacteria. El más útil de estos genes codifica un ARN llamado ARN 16S en bacterias y arqueas, y ARN 18S en eucariotas. La secuencia de este gen indica a qué grupo pertenece un microbio (y con frecuencia puede incluso indicar el género y la especie). La secuenciación de genes no era fácil hace apenas unas décadas, pero hoy es una rutina.

b. ¿La muestra a estudiar incluye solo un tipo de microbio o una comunidad de diferentes microbios? Los microbios rara vez viven aislados, sino que comunidades de diferentes microorganismos comparten un espacio vital común (lo que complica las cosas). Sin embargo, a veces, en determinadas condiciones ambientales, un tipo particular de microbio puede tener mucho éxito y acabar predominando. La microscopía óptica puede proporcionar una primera pista al respecto: ¿son todas las células muy similares en tamaño, forma y color?

Hoy en día es posible secuenciar *todo el ADN* presente en una muestra dada, sin necesidad de cultivar los microbios en el laboratorio. La muestra puede ser unos gramos de tierra, o de agua de mar o agua dulce filtrada para concentrar los microbios. Esta disciplina se llama *metagenómica*. Se comienza purificando todo el ADN de la muestra y luego se secuencia. El resultado es una lista desordenada de

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

pequeños fragmentos de ADN de secuencia de nucleótidos conocida. Sin embargo, estos fragmentos se pueden ensamblar en segmentos más grandes, luego en genes, luego en segmentos genómicos más grandes y, si es posible, incluso en genomas completos. Esto requiere el uso de métodos informáticos (una disciplina llamada *bioinformática*). Para investigar el número de microbios presentes en la muestra no necesitamos ensamblar sus genomas completos. Los mismos métodos bioinformáticos pueden clasificar el número de diferentes genes 16S-RNA y 18S-RNA presentes en la muestra, revelando así su complejidad. Si encontramos solo un tipo de gen 16S-RNA, se trata de un cultivo puro de un tipo de bacteria o arquea. Si hay varios tipos presentes, tenemos una comunidad de bacterias y/o arqueas diferentes. Si se detectan además genes 18S-RNA, también hay eucariotas (por ejemplo, protozoos que se alimentan de procariotas).

c. ¿Es posible cultivar un microbio de forma aislada? Es mucho más fácil estudiar un microbio si podemos aislarlo y cultivarlo en (o dentro de) medios de cultivo de laboratorio. En otro marco temático se explica una descripción detallada de los procedimientos de cultivo. Sin embargo, ahora se cree que la mayoría de los microbios no se pueden cultivar en el laboratorio. Esto se debe en gran medida a que tienen requisitos de crecimiento que no conocemos o que no podemos proporcionar en el laboratorio. Sin embargo, para saber realmente si podemos cultivar un microbio determinado, debemos intentarlo. El primer paso es tomar un pequeño trozo de la muestra en estudio (por ejemplo, de la comida en mal estado o de la pátina fluorescente en la superficie de la carne de la que hablamos antes) e inocularlo en lo que creemos que podría ser un medio de crecimiento adecuado. Ahora bien, existen varios tipos de medios de cultivo de laboratorio que podemos probar. Los llamados “medios ricos” incluyen todo tipo de nutrientes (aminoácidos, azúcares, vitaminas, etc.), mientras que otros, más específicos, incluyen solo una fuente de carbono y energía (por ejemplo, un azúcar como la glucosa) y una solución tamponada de sales. Cada microbio tiene sus propias preferencias.

Los medios de cultivo pueden ser líquidos, con los microbios así cultivados en frascos o botellas, o solidificados con agar, proporcionando una superficie húmeda en la que los microbios pueden crecer. Si la muestra se diluye adecuadamente y se extiende sobre la superficie del agar de modo que cada célula individual termine estando muy separada de la siguiente, y el cultivo se lleva a cabo a la temperatura adecuada (cada microbio tiene sus propias preferencias de temperatura), estas células pueden crecer, dividirse y eventualmente formar una colonia lo suficientemente grande como para ser vista a simple vista. Si todas las colonias en nuestra placa de agar tienen el mismo aspecto, la muestra podría ser un cultivo puro. Si las colonias que crecen tienen diferentes colores y morfologías, entonces la muestra inicial probablemente contenía varios microbios diferentes. Pero recuerde, no todos los microbios presentes en la muestra pueden estar representados; es posible que varios no hayan podido crecer en la superficie del agar porque no se cumplieron las condiciones que requieren. Sin embargo, ahora podemos tomar muestras de las colonias que hemos cultivado, replicarlas en agar nuevo y estudiar los microbios que las forman de forma aislada.

d. ¿Cuáles son los requisitos de crecimiento de un microbio determinado? Los microorganismos son capaces de aumentar su masa celular y proporcionar energía para mantener en funcionamiento su maquinaria celular (sí... la vida es una lucha contra las leyes de la termodinámica; requiere energía). Algunos microbios son muy exigentes y sólo pueden utilizar una gama limitada de nutrientes, mientras que otros son más versátiles. Por ejemplo, algunas bacterias están especializadas en metabolizar azúcares, mientras que otras prefieren aminoácidos (derivados de proteínas), grasas o incluso hidrocarburos similares a los presentes en el petróleo crudo. Y, sin duda, hay muchas bacterias que metabolizan combinaciones de estos compuestos. De hecho, los microbios utilizan habitualmente una amplia gama de nutrientes como fuentes de carbono, nitrógeno, azufre, etc., y pueden obtener su energía no sólo de azúcares y grasas, sino en algunos casos incluso de compuestos inorgánicos o de la luz solar. Los que utilizan la luz se denominan microbios fotosintéticos (la fotosíntesis evolucionó por

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

primera vez en las bacterias hace más de 2000 millones de años; las plantas aparecieron mucho, mucho más tarde, y adquirieron el truco de las bacterias fotosintéticas).

También debemos recordar que las señales ambientales pueden someter a los microbios a un estrés significativo, y solo sobrevivirán aquellos que puedan adaptarse. Factores ambientales como la concentración de sal, la temperatura, el nivel de radiación luminosa o de oxígeno, la humedad o la presencia de sustancias tóxicas (incluidas concentraciones excesivas de ciertos metales) pueden determinar qué microbios sobrevivirán y cuáles no. Por ejemplo, algunos microbios están adaptados a la vida en ambientes salados y simplemente no crecerán en agua dulce, pero otros tienen la preferencia opuesta... y sí, algunos pueden arreglárselas en ambos. Lo mismo ocurre con la temperatura: a algunos les gusta el frío, a otros el calor y a otros el calor, muchísimo. De hecho, se han encontrado microbios en prácticamente todos los ambientes que contienen agua líquida, desde algunos grados por debajo de 0 °C (el agua salada puede seguir siendo líquida a temperaturas ligeramente inferiores a 0 °C) hasta más de 100 °C (bajo la presión adecuada, el agua puede permanecer líquida a temperaturas de aproximadamente 110 °C). La presencia de concentraciones muy altas de hierro o arsénico, como las que se encuentran en las aguas del río Tinto en España, también ejerce una fuerte presión selectiva, pero muchos microorganismos se han adaptado a la vida en estas condiciones.



Los microbios se han adaptado a vivir en muchos entornos diferentes, incluso entornos extremos. **A)** Un lago salado en el desierto de Atacama (Chile); a pesar de la altísima concentración de sal, hay microbios y crustáceos (que sirven de alimento a los flamencos). **(B)** El río Tinto (España); sus aguas contienen altas concentraciones de óxido de hierro (de ahí el color rojo), así como otros metales tóxicos para muchas formas de vida. Sin embargo, muchos microbios se han adaptado a la existencia en estas aguas y forman parte de ecosistemas complejos. **C, D)** Fuentes hidrotermales en las islas Azores. Estas aguas son muy calientes y ricas en compuestos que contienen azufre, pero aun así albergan ciertos tipos de microbios. De hecho, se han aislado microbios en muchas fuentes termales similares. (Fotos de F. Rojo)

Pero, ¿es posible saber qué necesidades de crecimiento tiene un determinado microbio? En primer lugar, se puede hacer una estimación basada en el entorno del que se tomó la muestra original, pero solo la experimentación repetida le permitirá saberlo con seguridad. Debe intentar cultivar su

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

microbio en diferentes condiciones, con diferentes nutrientes, a diferentes temperaturas y salinidades, con o sin oxígeno, etc. Si tiene suerte y paciencia, puede descubrir las condiciones en las que su microbio puede crecer.

e. ¿Qué puedo hacer si el microbio que me interesa no se puede cultivar en el laboratorio, pero la metagenómica me dice que el microbio está presente en una muestra determinada? En este caso, hay que confiar en la bioinformática. Si los resultados metagenómicos nos han proporcionado la secuencia de al menos algunos de los genes de su microbio, puede comparar estas secuencias con las de otros microbios para los que hay información genética y fisiológica disponible en la literatura científica y en los bancos de datos genómicos. Los genes que comparten una homología de secuencia significativa (es decir, sus secuencias son similares) suelen codificar productos con funciones similares, pero ¡cuidado con las malas interpretaciones! Por ejemplo, dos enzimas de dos tipos diferentes de microbios que muestran una homología de secuencia significativa probablemente catalizarán reacciones bioquímicas similares, ¡pero quizás en diferentes vías metabólicas! De manera similar, imagine que encuentra un gen en el microbio que está estudiando que codifica una proteína muy similar a otra que usted *sabe que* está presente en un microbio diferente, bien caracterizado, y en el que se sabe que regula la expresión de otro gen. Puede deducir que el gen encontrado en su análisis metagenómico también codifica una proteína que regula el mismo gen que en el microbio bien caracterizado. Lo más probable es que tenga razón en la primera suposición: ambas proteínas probablemente serán reguladoras de la expresión de otro gen. Pero corre el riesgo de equivocarse con la segunda suposición: es posible que no necesariamente regulen los *mismos* genes en los dos microbios.

f. ¿He aislado un nuevo microbio! ¿Puede colonizar plantas, animales o seres humanos? Y, si es así, ¿Podría su influencia ser beneficiosa o perjudicial? Esta es una pregunta importante, y no tan fácil de responder. Algunos microbios pueden vivir asociados de una forma u otra con plantas o animales y no causar ningún problema; incluso pueden ser beneficiosos. Por ejemplo, todos tenemos un *ecosistema microbiano en nuestra piel* que nos protege de la entrada de microbios patógenos, y la digestión de los alimentos en todos los animales (incluidos nosotros mismos) se basa en la acción de una microbiota intestinal compleja. Y con respecto a las plantas, muchos microbios pueden vivir en la superficie de las hojas, asociados a las raíces (p. ej., en el trébol y los garbanzos ayudan a la planta a obtener los nitratos que necesita), o incluso en el interior del sistema vascular, sin causar ningún problema.

Sin embargo, otros microbios tienen una naturaleza más agresiva y pueden "alimentarse" de tejidos animales o vegetales, causándoles daño. Estos se dividen en dos grupos: patógenos especializados y patógenos oportunistas. Los patógenos especializados solamente pueden sobrevivir en un anfitrión, raramente pueden ser encontrados en otro lugar. Los patógenos oportunistas, por el contrario, no están especializados y pueden vivir en muchos entornos diferentes, siendo las plantas o los animales (incluidos los humanos) sus posibles hábitats. Estos microbios pueden utilizar muchos compuestos diferentes como nutrientes, pueden soportar muchas condiciones adversas y se encuentran comúnmente en suelos y agua, así como en plantas o animales infectados. Una vez más, el sistema inmunológico generalmente los mantiene bajo control e impide su crecimiento en tejidos y órganos, pero si falla, su capacidad de "alimentarse" de materia orgánica (es decir, nuestros tejidos) puede hacerlos muy peligrosos. Su bajo nivel de especialización significa que a menudo pueden aprovechar una oportunidad de "alimentarse" que los convierte en patógenos... de ahí el nombre de patógenos oportunistas. Desafortunadamente, estos microbios son comúnmente bastante resistentes a los antibióticos.

Si ha aislado un microbio y quiere saber si puede ser patógeno, primero debe hacer una suposición fundamentada y luego comprobar si está en lo cierto. Por ejemplo, ¿de dónde ha aislado el microbio? Si es del agua de mar, lo más probable es que esté adaptado a la vida en altas concentraciones de sal y, por tanto, nuestros tejidos no serían un hábitat ideal. Pero existen excepciones. La única forma de saberlo es ver en qué crecerá. Las primeras rondas de investigación deben incluir la determinación de la temperatura y las sales necesarias para un crecimiento óptimo y qué compuestos puede utilizar

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

como nutrientes. Si puede actuar como un patógeno humano, probablemente crecerá a 37 °C, nuestra temperatura corporal. Ahora hay disponibles en el mercado pruebas sencillas y estandarizadas que le permitirán averiguar fácilmente qué compuestos puede asimilar o modificar un microbio y qué agente antimicrobiano puede inhibir su crecimiento. Los resultados le proporcionarán un patrón metabólico y de sensibilidad antimicrobiana para el microbio, que se puede comparar con otros patrones conocidos para diferentes grupos microbianos. Esto es rápido y sencillo y se utiliza para la caracterización rápida de microbios en hospitales. También hay métodos más completos, aunque requieren más trabajo. El principal es, de nuevo, aislar el ADN del microbio y secuenciar el gen para el ARN 16S (procariotas) o el ARN 18S (eucariotas), como se explicó anteriormente, y compara tus resultados con los de los bancos de datos públicos (que hoy en día albergan *enormes* cantidades de información); esto identificará el microbio conocido más similar al suyo. Si hay una coincidencia, ¡bingo! Ha recorrido un gran camino hacia saber si su microbio puede ser patógeno. Sin embargo, si no hay coincidencia, es posible que tenga un nuevo microbio y deberá estudiarlo desde cero. Tal como se describió anteriormente, esto incluirá analizar su comportamiento (medio en el que puede crecer, temperatura óptima, concentración de sal, su capacidad para infectar hojas de plantas o tejidos animales, etc.), secuenciar su genoma completo y luego comparar genes individuales con aquellos presentes en bases de datos para identificar los parientes más cercanos de su nuevo microbio (y, por lo tanto, qué características podría esperar que tenga). Ciertamente, es una buena idea buscar genes que se sabe que facilitan el comportamiento patógeno, como los que codifican proteasas (que cortan las proteínas), lipasas (que cortan los lípidos) o una de las muchas toxinas que producen los patógenos.

5. *¿Puede un microbio modificar el entorno en el que vive?* Al final, *todos los seres vivos* influyen y modifican el entorno en el que viven. Los microbios consumen nutrientes y producen desechos. Dependiendo de lo que un microbio consume y excreta, su efecto sobre el medio ambiente será diferente. Por ejemplo, el consumo de azúcares generará CO₂ como desecho, lo que probablemente acidificará el medio de crecimiento. Pero si las células utilizan aminoácidos como alimento, también excretarán amoníaco, lo que hará que el medio circundante sea más alcalino. Muchos microbios procariotas producen metano (u otros gases con un potente efecto invernadero) en lugar de CO₂, los microbios del intestino de los rumiantes son un buen ejemplo, pero hay muchos otros entornos que albergan microbios productores de metano.

Los productos consumidos y secretados por un microbio pueden detectarse y sus tasas de consumo o secreción pueden medirse, siempre que operemos en un sistema cerrado, como un matraz o un fermentador en el que podamos medir cuidadosamente lo que se consume y lo que se produce (incluso gases). Para unos pocos microbios modelo para los que se dispone de una gran cantidad de información, los bioinformáticos han construido lo que llamamos "modelos metabólicos". Básicamente, se trata de una lista de reacciones bioquímicas que se sabe que ocurren en el microbio. Si se proporciona a un modelo suficiente información de buena calidad sobre qué compuestos consume el microbio, a qué ritmo y la tasa de aumento de la biomasa del cultivo, puede predecir las reacciones metabólicas que probablemente impulsan sus flujos de metabolitos y decirnos qué compuestos secretará. Cuanto más completo sea el modelo (es decir, cuantas más reacciones bioquímicas le digamos que realiza nuestro microbio) y cuanto mejores sean los datos experimentales proporcionados, más precisas serán sus predicciones. Pero, por supuesto, los modelos solo hacen predicciones: solo nos permiten saber qué compuestos debemos intentar medir experimentalmente y cuantificar en el medio de cultivo. Los modelos metabólicos son muy útiles y pueden proporcionar buenas predicciones si los datos de entrada son precisos y completos, pero siempre necesitamos probar sus predicciones.

6. *¿Se puede modificar el genoma de un microbio? ¿Podemos crear mutantes?* Una forma muy poderosa de estudiar los microbios, sus propiedades, su capacidad de interactuar con el medio ambiente y la función de determinados genes, es generar mutantes de los genes de interés, modificando así su

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

función o inactivándolos. Por ejemplo, si eliminamos un gen de una bacteria resistente a un antibiótico determinado y la consecuencia es que se vuelve sensible a ese antibiótico, entonces hemos encontrado un gen probablemente implicado en su resistencia original a ese antibiótico (sabiendo que el hecho de que el gen que confiere resistencia al antibiótico sea algo que requerirá más trabajo). Sin embargo, al crear mutantes, el objetivo no siempre es eliminar un gen: a veces es mejor alterarlo y, por lo tanto, modificar la proteína que codifica. También podríamos alterar la expresión de ese gen y, por lo tanto, modificar la cantidad de proteína producida. Si alguna de estas modificaciones produce un cambio en el comportamiento del microbio, nos da información sobre la función del gen. La modificación de genes específicos en microbios bien conocidos también puede ayudarnos a dirigirlos para que realicen tareas que nos sean útiles; esta es la base de la *biotecnología*. Por ejemplo, se podría modificar un gen para permitir que un microbio degrade más fácilmente un compuesto tóxico (la base de *Biorremediación*), o bien producir y secretar un producto valioso que pueda purificarse y comercializarse.

Existen dos enfoques que podemos adoptar para modificar o inactivar genes. Uno no es específico de un gen y se basa en tratar el microbio con un agente que modifica el genoma al azar, por ejemplo, un compuesto mutagénico (una sustancia química) o una radiación de suficiente energía (por ejemplo, luz ultravioleta). El otro se basa en técnicas que permiten la mutación de un solo gen de interés específico.

La mutagénesis aleatoria puede causar mutaciones simultáneas en varios genes (y los tratamientos más fuertes generan más mutaciones por genoma). Sin embargo, demasiadas mutaciones pueden comprometer la viabilidad de una célula. Además, averiguar si se ha logrado mutar un gen que nos interesa no es sencillo; hay que hacer un análisis en función de la pérdida (o quizás la ganancia) de una característica que se puede observar fácilmente. Se podrían, por ejemplo, seleccionar genes que, al inactivarse, aumenten o reduzcan la resistencia de una bacteria a un antibiótico determinado. Sin embargo, cuanto mayor sea el genoma del microbio analizado, menor será la probabilidad de que se produzca una mutación en un gen de interés en lugar de en un gen no relacionado.

Dirigir las mutaciones a un gen específico es mucho más útil, pero tiene sus propios problemas. Existen muchas técnicas para modificar o inactivar un gen específico, pero algunas son muy sofisticadas. Y no todos los microbios son igualmente susceptibles a la manipulación genética. Un gen mutante suele construirse *in vitro*, fuera del microbio original de interés, utilizando un plásmido (una pieza circular de ADN auto replicante independiente) para sostenerlo y transportarlo, y un organismo modelo para hospedarlo (normalmente una cepa de laboratorio de *Escherichia coli*). El gen modificado puede entonces introducirse en el genoma del microbio en estudio. La facilidad de este paso depende de si el microbio es susceptible o no a la manipulación genética. De hecho, los microbios tienen mecanismos de defensa para minimizar la entrada de ADN extraño (por ejemplo, un virus o un plásmido no deseado que puede comportarse de manera parasitaria), y dichas barreras son más efectivas en algunos microbios que en otros. Muchas de estas barreras han sido desactivadas en las cepas bacterianas modelo que se utilizan rutinariamente en los laboratorios de investigación. Si se puede introducir ADN extraño que contiene un gen modificado en el microbio que estamos estudiando, entonces podríamos ser capaces de intercambiar el gen original por el modificado (mutante). Esto ayuda a imponer una fuerte presión de selección que seleccionará la presencia del gen modificado. No es el objetivo de este capítulo hacer una lista de todas las técnicas disponibles para manipular genes, pero a continuación se ofrece una visión general de lo que se puede hacer y de los resultados que se pueden esperar.

a. *Inactivación de un gen.* Un gen puede inactivarse mediante la inserción de un segmento de ADN dentro de él, interrumpiendo así la secuencia de codificación, un poco como cambiar la oración: *Me gustaría un huevo para el desayuno. A me gustaría un huevo XYZ para el desayuno.* Este segmento introducido normalmente contendrá un gen marcador, por ejemplo, que confiere resistencia a un antibiótico al que el microbio es sensible. Esto permite la selección rápida del mutante. La inactivación también se puede lograr eliminando un pequeño segmento interno del gen, o incluso el gen completo, utilizando una variedad de técnicas sofisticadas.

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

b. *Modificación genética.* A veces queremos modificar la secuencia de un gen para hacer una proteína mutante específica. Esto se hace para analizar la función de una región determinada de la proteína que codifica, o de un residuo de aminoácido determinado en esa proteína. Para ello, podemos construir un gen mutante utilizando técnicas de ingeniería genética o sintetizando químicamente un segmento de ADN a medida. Las modificaciones pueden incluir la introducción de un codón de terminación aguas arriba del natural (en este caso, la proteína producida carecerá de un segmento terminal y será más corta, por ejemplo). *Me gustaría un huevo para*, o la alteración de uno o más codones (en este caso la proteína producida tendrá mutaciones dirigidas al sitio en los residuos de aminoácidos de nuestra elección, por ejemplo, *Me gustaría una ugg para desayunar*).

c. *Modificación de la expresión genética.* Aquí no modificamos el gen en sí, sino su expresión (aumentándola o reduciéndola) con la esperanza de ver un efecto que revele la función de ese gen. Nuevamente, existen varias técnicas para hacer esto.

Posibles Implicaciones de nuestras decisiones respecto a los microbios

1. Individual

- a. *¿Debemos tener miedo de los microbios?* Por supuesto, los microbios pueden crecer en nuestros alimentos, pero en algunos casos esto puede ser beneficioso (yogur, kéfir, pan, queso) y en otros potencialmente dañino (cuando hay bacterias patógenas o productoras de toxinas). La mayoría de las bacterias son *menos* dañinas., pero evitando aquellos que puedan ser perjudiciales puede preservar nuestra salud.
- b. *¿Debo limpiar esta superficie?* Los microbios colonizan superficies y forman biopelículas, pero ¿Hasta qué punto es necesario limpiarlos? Por ejemplo, sería muy importante limpiarlos de los equipos de la industria láctea, pero no tanto como esterilizar las botas de montaña.
- c. *¿Debo conservar mi comida en el refrigerador?* Muchos microbios, y ciertamente la mayoría de Los que pueden ser patógenos no crecen bien a temperaturas inferiores a 10 °C, aunque existen excepciones (hay algunas bacterias patógenas que pueden crecer a 5 °C). Cocinar o esterilizar los alimentos es una buena solución, pero cuando se trata de alimentos frescos, debemos preguntarnos si es ventajoso agregar compuestos que impidan el crecimiento de microbios. Tenemos que sopesar los beneficios y los inconvenientes.

2. Políticas comunitarias y nacionales

- a. Regular la seguridad de los alimentos y bebidas.
- b. Costos de salud por vivir en ambientes contaminados con microbios patógenos.
- c. Valorar los servicios ecosistémicos proporcionados por los microbios.

Participación de los alumnos

1. Discusiones en clase

- a. Discuta el proceso del método científico para resolver preguntas.
- b. Discuta si modificar el genoma de un microbio puede ser peligroso y neutral o beneficioso para la sociedad
- c. Al crear mutantes de un microbio determinado, ¿es mejor utilizar mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida? ¿Siempre podemos elegir?

Un marco educativo en microbiología centrado en la niñez

- d. ¿Los microbios son buenos o malos?
- e. ¿Dónde crees que pueden vivir los microbios?
- f. ¿Por qué son importantes los microbios en la biotecnología? ¿Puedes darme un ejemplo?
- g. ¿Alguna vez has visto comida en mal estado, agua verde o cualquier otro indicador de la presencia de microbios en la vida cotidiana?

2. Ejercicios

- a. Enumere los pasos que debe seguir para demostrar que un microbio es responsable del deterioro de la mayonesa.
- b. ¿Qué pasos se deben seguir para estudiar un microbio implicado en una enfermedad?
- c. ¿Cuántos contaminantes conoces? Si quisieras biorremediar uno de ellos, si se utiliza un microbio que puede asimilar el contaminante, ¿dónde se podría encontrar ese tipo de microbio? (Haga una suposición fundamentada...)
- d. Partiendo de una bacteria sensible a un antibiótico, piense en la forma más sencilla de aislar un mutante que ha adquirido resistencia a ese antibiótico.