BIBLIOGRAFIA:

Adler,J. (1975) Chemotaxis in bacteria. Ann.Rev.Biochem. 44; 341-356.

Aizawa,S.,G.E.Dean, C.J.Jones,R.M.Macnab and S.Yamaguchi (1985) Purification - and characterization of the flagellar hook basal body complex of --- Salmonella typhimurium. J.Bacteriol. 161(3):836-849.

Berg,H.C. and D.A.Brown (1972) Chemotaxis in E.coli analyzed by three-dimensional tracking. Nature(London) 239: 500-504.

Calladine,C.R. (1978) Change of waveform in bacterial flagella: the role of mechanics at the molecular level. J.Mol.Biol. 118: 457-479.

Chet,I. and R.Mitchell (1976) Ecological aspects of microbial chemotactic behavior. Ann.Rev.Microbiol. 30: 221-239.

Doetsch,R.N. and R.D.Sjoblad (1980) Flagellar structure and function in Eubacteria. Ann.Rev.Microbiol. 34: 69-108.

Homma,M.,K.Kutsukake and T.Iino (1985) Structural genes of flagellar hook-associated proteins in S.typhimurium. J.Bacteriol. 163(2): 464-471.

Krupski,G.,R.Götz,K.Ober,E.Pleier and R.Schmitt (1985) Structure of complex -- flagellar filaments in R.meliloti. J.Bacteriol. 162(1): 361-366.

Macnab,R.M. and M.K.Ornston (1977)Normal to curly flagellar transitions and their role in bacterial tumbling stabilization of an alternative quaternary structure by mechanical force. J.Mol.Biol. 112: 1-30.

Parkinson,J.S. 1977) Behavioral genetics in bacteria. Ann.Rev.Genet. 11:397-414

Raimondo,L.M.,N.P.Lundh and R.J.Martinez (1968)Primary adsorption site of phage PBS1: the flagellum of B.subtilis. J.Virol. 2(3): 256-264.

Schmitt,R.,I.Raska and F.Mayer (1974) Plain and complex flagella of Pseudomonas rhodos:analysis of fine structure and composition. J.Bacteriol. 117(2) 844-857.

Shade,S.Z.,J.Adler and H.Ris (1967) How bacteriophage chi attacks motile bacteria. J.Virol. 1(3): 599-609.

Silverman,M. and M.I.Simon (1977) Bacterial flagella. Ann.Rev.Microbiol. 31:397 -419.

Smith,D.G. (1978) Bacterial motility and chemotaxis. p.321-342. In A.T.Bull and P.M.Meadow (ed). Companion to Microbiology. Longman,London and N.Y.

Smith,R.W. and H.Koffler (1971) Bacterial flagella. Adv.Microbiol.Physiol. 6: 219-339.

Spencer,M. (1984) Progress in flagellation. Nature (London) 309: 404-405.

Spencer,M. (1984) Surprises from Halobacteria. Nature(London) 310: 367.

Springer,M.S.,M.F.Goy and J.Adler (1979) Protein methylation in behavioural - control mechanisms and in signal transduction. Nature 280: 279-284.

Suzuki,T.,T.Iino,T.Horiguchi and S.Yamaguchi (1978) Incomplete flagellar structures in nonflagellate mutants of S.typhimurium. J.Bacteriol. 33(2): 904-915.

Taylor,B.L. and D.E.Koshland (1974) Reversal of flagellar rotation in monotrichous and peritrichous bacteria: generation in changes in direction. J.Bacteriol. 119(2): 640-642.

Taylor,B.L. (1983)Role of proton motive force in sensory transduction in bacteria. Ann.Rev.Microbiol. 37: 551-573.

Thomashow,L.S. and S.C.Rittenberg (1985) Waveform analysis and structure of -- flagella and basal complexes from Bdellovibrio bacteriovorus 109J. J.Bacteriol. 163(3): 1038-1046.

Wagenknecht.T.,D.J.DeRosier,S.Aizawa and R.M.Macnab (1981) Flagellar Hook structures of Caulobacter and Salmonella and their relationship to filament structure. J.Mol.Biol. 162: 69-87.

CUBIERTAS MUCILAGINOSAS

DEFINICION:

Muchos microorganismos presentanuna capa externa de material mucilaginoso que rodea completamente la célula y que cubre la pared celular; a esa - capa demostrable microscópicamente se le llama **CAPSULA.** Este material capsu-- lar se encuentra en la mayoría de las **bacterias**, principalmente **bacilos** tanto- **grampositivos** como **gramnegativos** aislados recientemente de sus hábitats naturales y de sistemas patogénicos; asi como también en **hongos, levaduras y algas.**

La formación de cápsula no es característica de **especie.**

VISUALIZACION AL MICROSCOPIO:

La técnica comunmente empleada para visualizar microscópicamente -- las cápsulas bacterianas es la **Tinción negativa ó Preparaciones en tinta china.** Estas preparaciones dan información acerca del **TAMAÑO y FORMA** de la cápsula, - pero dicen muy poco sobre la **ESTRUCTURA FISICA.**

Fig.1.Capsulas bacterianas mostradas dispersando las células en tinta china. El organismo - es Bacillus megaterium. Tomado de Stanier, - Adelberg, Ingraham (1976).The Microbial World.

Las principales dificultades para hacer las preparaciones para el - microscopio de luz o electrónico son:

A)Las cápsulas por ser geles altamente hidratados, sufren una deformación estructural **(se colapsan)** debido al proceso de deshidratación indispensable para la mayoría de las técnicas preparativas de microscopía, ya que el agua es reemplazada- por solventes orgánicos como alcoholes ó acetona.

B)Las cápsulas tienen poca densidad y no se tiñen rápido con- los reactivos convencionales.

Hasta ahora, la estabilización mas exitosa de la cápsula se ha efectuado por **pretratamiento de las células con anticuerpos anti-capsula.** Asi, la deshidratación subsecuente no ocasiona colapso estructural, pero **la estructura fina se oscurece**, ya que la mayoría de la masa de la cápsula consiste de **complejos polisacárido-IgG.** La estabilización del material capsular por exposición de los organismos capsulados al anticuerpo específico se debe a que la cápsula forma un **producto tipo gel** incrementándosela densidad de la masa y el tamaño de la cápsula, motivos por los que latécnica se ha designado **"Quellungsreaktion"** de Neufeld

La visualización de los polisacáridos capsulares se ha intentado con varios grados de éxito mediante el uso de colorantes como el **ROJO-DE RUTENIO** , el **AZUL ALCIAN** ó **ACIDO FOSFOTUNGSTICO** y compuestos afines. - Estos últimos se aplican después de embeber la muestra. Aunque el tratamiento con **rojo de rutenio** estabiliza la estructura capsular y aumenta la densidad de los polisacáridos capsulares, el grosor de la cápsula se reduce grandemente en comparación con el grosor mostrado por células tratadas con anticuerpo o con la técnica de Bayer et al. El uso de **acido fosfotúngstico** no incrementa el contraste del dominio capsular. Las cápsulas tratadas con anticuerpos son **mas grandes en tamaño y mas homogeneas en su matriz, y muestran un contorno superficial relativamente mas liso** que las cápsulas preparadas o teñidas con rojo de rutenio.

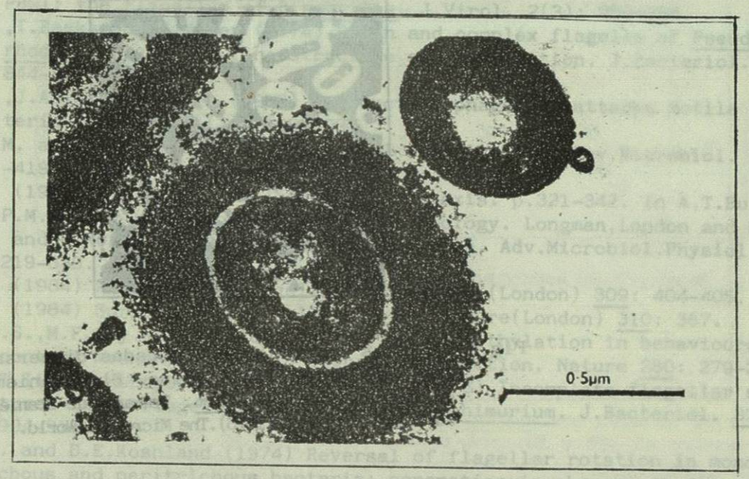

Fig.2. Mucilago de naturaleza polisacárida teñido con rojo de rutenio mostrando un arreglo concentrico de fibras.
Tomado de H.C. Jones, I.L. Roth y W.M. Sanders. J.Bacteriol. (1969) 99: 316.

En 1985 Bayer et al diseñaron un nuevo método para la preservación estructural de la cápsula, consistente en la combinación de un procedimiento de deshidratación con dimetilformamida (DMF) con una disminución progresiva de la temperatura embebiendo las muestras en Lowicryl K4M.

ESTRUCTURA FINA:

Cuando la técnica de Bayer es aplicada a cortes finos, la cápsula se puede identificar pos su bajo contraste electrónico, aparece como una capa de 0.75 um de grosor mostrando una gran cantidad de fibrillas embebidas en una matriz granular fina. Las fibrillas delgadas se extienden radialmente desde la pared celular y atraviezan la

El dominio capsular completo y la membrana externa unen anticuerpo anticapsular, mientras que el espacio periplásmico y la mayor parte de la membrana interna carecen de inmunocolorante específico de cápsula. Estas - características se muestran en la siguiente figura.

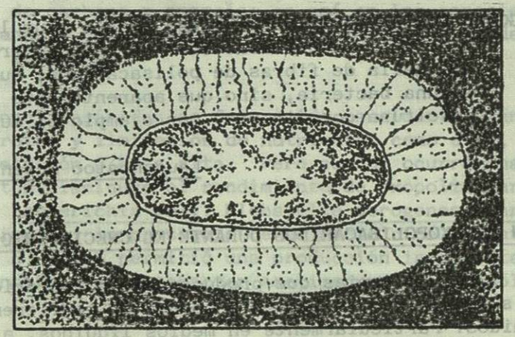

Fig.3. Ultraestructura de las capsula de E.coli. Los polisacaridos capsulares se observan como microfibrillas radiales embebidas en una matriz granular fina.

EXTRACCION DE CAPSULAS:

Existen varios métodos alternativos para el aislamiento de los materiales mucilaginosos, puede lograrse mediante la agitación vigorosa -- del cultivo y posterior centrifugación o bien empleando soluciones diluídas de álcalis o ácidos. Para liberar componentes de algunas microcápsulas es preciso utilizar agentes como el ácido tricloroacético, fenol acuoso o etilenglicol tomando las precauciones pertinentes ya que estos agentes pueden ocasionar la degradación del material capsular.

CLASIFICACION DE LAS CAPSULAS:

Desde el punto de vista anatómico hay dos categorías de cubiertas mucilaginosas, **las cápsulas ó cubiertas adherentes y los mucílagos o cubiertas no adherentes**, sus características son:

1.-**CAPSULAS O CUBIERTAS ADHERENTES:** Es una cubierta gelatinosa, relativamente estrecha que presenta una orientación ú organización alrededor de cada organismo, no tiene una membrana superficial morfológicamente diferenciada, pero si un contorno liso. Estas cubiertas que permanecen adheridas cuando las células se suspenden - en agua, se agrupan en dos categorías dependiendo de su **grosor:**

a)MICROCAPSULAS: Cápsulas con un espesor menor de 200 nm- que no se pueden demostrar con el micros copio óptico, pero si con el electrónico Son presentadas por miembros de la familia Enterobacteriaceae.

b)MACROCAPSULAS: Son demostrables al microscopio óptico y poseen un espesor de por lo menos 200 nm Presentan una superficie externa definida, por ejemplo las capsulas presentadas por Klebsiella aerogenes, Enterobacter,- Streptococcus pneumoniae, Bacillus sp

2.-**MUCILAGOS o CUBIERTAS NO ADHERENTES:** Es una acumulación desorganizada de- material viscoso alrededor de las bacterias, constituída por -- una malla de fibras de polisacáridos, que no está asociada con- alguna bacteria, sino que aparentemente cumple una función como envoltura comunitaria, por ejemplo el mucílago de:

Leuconostoc mesenteroides

PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS DURANTE EL CRECIMIENTO:

Las bacterias que producen exopolisacáridos capsulares se reconocen por su apariencia colonial y porque le confieren viscosidad a los cultivos líquidos. Particularmente en medios líquidos, a medida que los culti-- vos envejecen, ocurre la disolución de las cápsulas, de tal manera que ade-- más de las bacterias que retienen las cápsulas, pueden detectarse mucílago - libre y bacterias no capsuladas.

La producción de exopolisacárido ocurre a través de todas las - faes del crecimiento bacteriano en muchas especies, pero en una Pseudomonas, la síntesis del polímero comienza hasta que se alcanza la fase logaritmica - tardía como si fuese un **metabolito secundario.** Esto quiza se deba a la dispo nibilidad del lipido isoprenoide que participa no solo en la síntesis de la- cápsula sino también en la formación de peptidoglicana y lipopolisacarido.

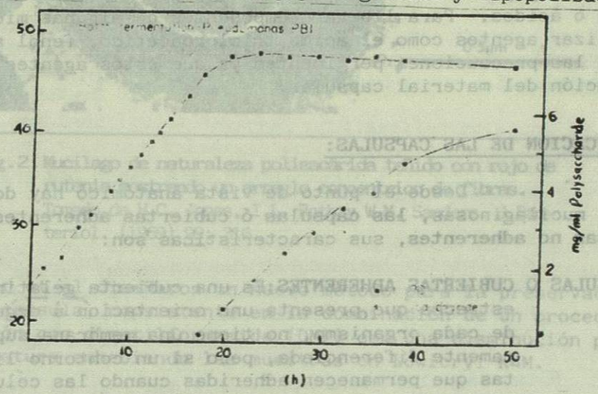

Fig.4. La producción de exopolisacárido por un pseudomonadal

EFECTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE LA FORMACION DE CAPSULAS

La cantidad de material capsular y el tamaño son controlados por las condiciones nutricionales o ambientales. La mayoría de los trabajos sobre los- efectos de las condiciones fisiológicas en la producción de polisacáridos - capsulares se han realizado con bacterias aerobicas o anaerobias facultati-- vas, por lo que las siguientes notas se aplican a tales organismos; aunque - algunas especies de Clostridium y bacterias del rúmen también producen exopo lisacáridos

1.- La composición del polímero capsular es **INDEPENDIENTE** del sustrato em--- pleado como fuente de carbono y energía; no así en las especies bacteria nas que forman **levanas o dextranas**; éstas sólo son sintetizadas en me--- dios que contienen **sacarosa.**

2.- la formación de exopolisacáridos es favorecida usualmente cuando hay un- **exceso de carbohidratos y limitación de nutrientes como el P, N o S;** es decir, cuando la relación C/N es alta. Pero cuando ocurre una limita--- ción de carbohidratos disminuye el rendimiento de exopolisacaridos. En organismos como Escherichia coli, Klebsiella aerogenes, Chromobacter violaceum y Rhizobium sp, la presencia de un medio rico en carbohidratos pero deficiente en N, P o S permitió una producción incrementada del - polímero capsular no así en Acetobacter acetigenum cuyo exopolisacárido- es la celulosa.

3.- Farhi en 1970 observó que los criptococos eran incapaces de formar cápsu la si se hacían crecer en medios de cultivo a los cuales se les incorpo- raba una de una gran variedad de sales o una alta concentración de gluco sa. Dykstra y colaboradores encontraron que es la **osmolaridad alta** del- medio la que influencia el tamaño de la cápsula y no la glucosa, pues - tanto la alta concentración de NaCl como la de glucosa suprimieron la - formación de esta envoltura envolvente.

4.- Dykstra y colaboradores han detectado tambien que el **pH** ofrece una in--- fluencia sobre la encapsulación. Estas envolturas fueron más grandes a pH 7 que a pH 5, pero el efecto fué en un menor grado que el inducido - por la glucosa; sin embargo estos resultados solamente son aplicables a Cryptococcus neoformans.

5.- **El alto grado de aireación** favorece la formación de exopolisacáridos en enterobacterias como Escherichia coli Y Klebsiella mientras que disminu ye la producción de celulosa en Acetobacter acetigenum. En Rhizobium - la producción del polímero capsular fué mayor bajo aireación reducida.

6.- La producción de exopolisacáridos se incrementa cuando el crecimiento - bacteriano ocurre a bajas temperaturas, lo anterior ha sido reportado - para dos cepas de Escherichia coli K12 cuyo polisacárido capsular es - sintetizado en cantidades incrementadas a 25°C pero no a 35°C que es su temperatura óptima de crecimiento, como se puede apreciar en la Figura- 5.

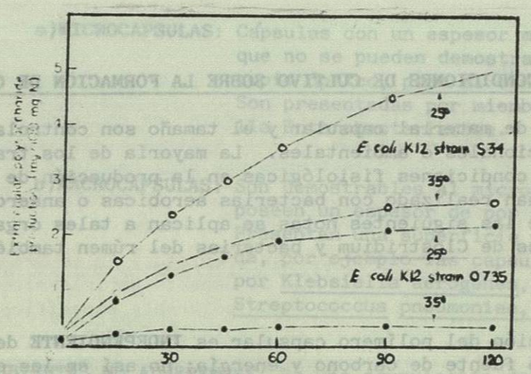

Fig.5. Producción de exopolisacarido en E.coli K12. Dos cepas derivadas de E.coli K12 fueron incubadas a 25° y 35°C en medios sintéticos y se determinó la producción de exopolisacarido en los frascos agitados.

COMPOSICION QUIMICA: El principal componente de la capsula y mucilagos es el **agua**, la cual constituye aproximadamente el 99% del peso de la estructura, adicionalmente contiene un elemento fibrilar comunmente denominado **POLISACARIDO EXTRACELULAR**, sin embargo en bacilos como B. subtilis y B. anthracis las fibrillas son **polipeptidos** constituidos de Acido D-glutámico unidos a tráves de sus grupos alfa amino y gamma carboxilo como se muestra en la figura 6.

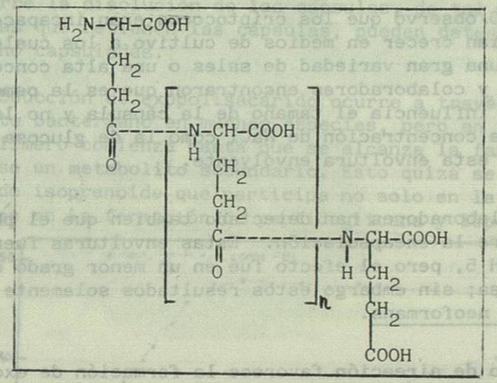

Fig. 6. Estructura del poliglutamato que es el componente fibrilar en muchos bacilos.

Se pueden distinguir dos grupos de expopolisacaridos capsulares que son: a)Homopolisacáridos y Heteropolisacáridos y b)Levanas y Dextranas.

1.- **HOMOPOLISACARIDOS Y HETEROPOLISACARIDOS** sinttizados en la membrana celular y luego liberados en el medio extracelular. Su síntesis es un proceso que involucra la participación de **Nucleosidos-difosfato-azúcares** como precursores y **Lipido isoprenoide** como acarreador membranal.

2.- **LEVANAS y DEXTRANAS**, su ocurrencia es más limitada y ss sintetizan mediante procesos extracelulares que no requieren de Nucleosidos-Difosfato-azúcares como precursores ni de Lipido acarreador; pero si dependen estrictamente de la presencia de sustratos específicos en el medio de cultivo tales como la sacarosa u oligosacaridos estrechamente relacionados.

Los exopolisacáridos bacterianos están compuestos por unidades repetitivas que contienen de 2 a 6 monosacaridos acompañados frecuentemente por sustituyentes acilo o acetales. Son generalmente lineales, de longitud variable, pero pueden presentar cadenas laterales de uno o más monosacáridos.

Entre los monosacáridos que forman los polímeros capsulares se encuentran:

A) **HEXOSAS NEUTRAS** como la D-glucosa, D-galactosa, D-Manosa que son de amplia ocurrencia,
B) **DESOXIAZUCARES** como la L-Fucosa y la L-Rhamnosa
C) **AMINOAZUCARES** como la N-acetilglucosamina y la N-acetilgalactosamina.
D) **ACIDOS URONICOS** como el Acido D-glucurónico y el Acido D-Galacturónico que le confieren una carga negativa al polisacárido. El Acido D- Manurónico ocurre escasamente.
E) **PENTOSAS**, la D-Ribosa y la D-Xilosa están presentes comunmente en los exopolisacáridos de levaduras y algas pero raros en bacterias.
F) **HEPTOSAS** no se han detectado
G) **POLIOLES** como el glicerol y el ribitol se encuentran como sustituyentes.
H) **OTROS COMPONENTES** como los grupos acetilo, O-acetilos, fosfatos formato o succinato pueden encontrarse también asociados en los exopolímeros.

Varios exopolisacáridos bacterianos son casi idénticos a los polímeros producidos por los eucariotes, entre ellos la celulosa, el ácido hialurónico, el alginato o el acido polisiálico. Sin embargo aunque son estructuralmente similares el mecanismo biosintético es diferente.

Hemos de recalcar que la síntesis de exopolisacáridos es dependiente de la disponibilidad de lípido acarreador presente en la membrana y que ésta se deprime cuando ocurre una reducción del lípido disponible.