

5. Metabolismo

5.1. Ciclos biogeoquímicos

Todos los organismos vivos participan de los ciclos biogeoquímicos pero los microorganismos debido a su ubicuidad, capacidades metabólicas diversas e intensa actividad enzimática, desempeñan el papel principal en el conjunto de estos ciclos. La intensidad o velocidad del ciclo para cada elemento es proporcional, en general, a la cantidad del mismo en la composición química de la biomasa.

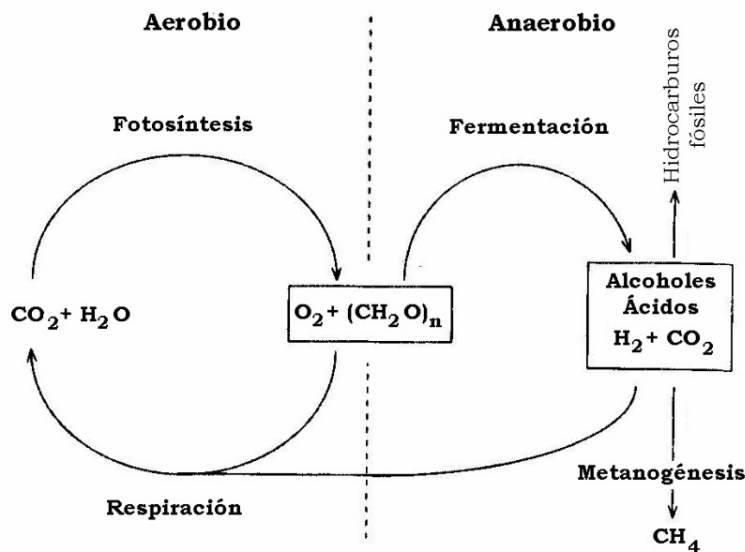


Figura 5.1. Interrelación de los ciclos biogeoquímicos del C, H y O (1)

Los principales componentes de los organismos (C, H, O, N, P y S) se reciclan con más intensidad. Los elementos secundarios (K, Mg, Na, halógenos) y los presentes en trazas (B, Co, Cr, Cu, Mo, Ni, Se, Sn, V, Zn) se reciclan con menor intensidad. Estos últimos se encuentran en cantidades muy pequeñas y no en todas las formas de vida.

Otros elementos son Fe y Mn que tienen un ciclo oxidorreductor, Ca y Si que forman estructuras exo y endoesqueléticas en macro y microorganismos. Los elementos no esenciales e incluso los tóxicos también se reciclan, tal como As, Cs, Hg y Sr.

Los microorganismos son una fuente de unos compuestos de la ecosfera y un sumidero para otros. La transformación de un elemento dentro de un hábitat puede asociarse a una población microbiana determinada o a múltiples poblaciones microbianas, vegetales y/o animales (3).

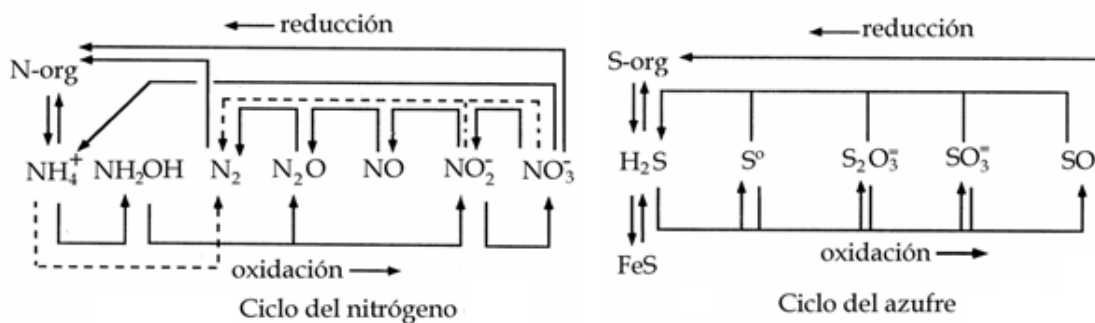


Figura 5.2. Ciclos de N y S (2)

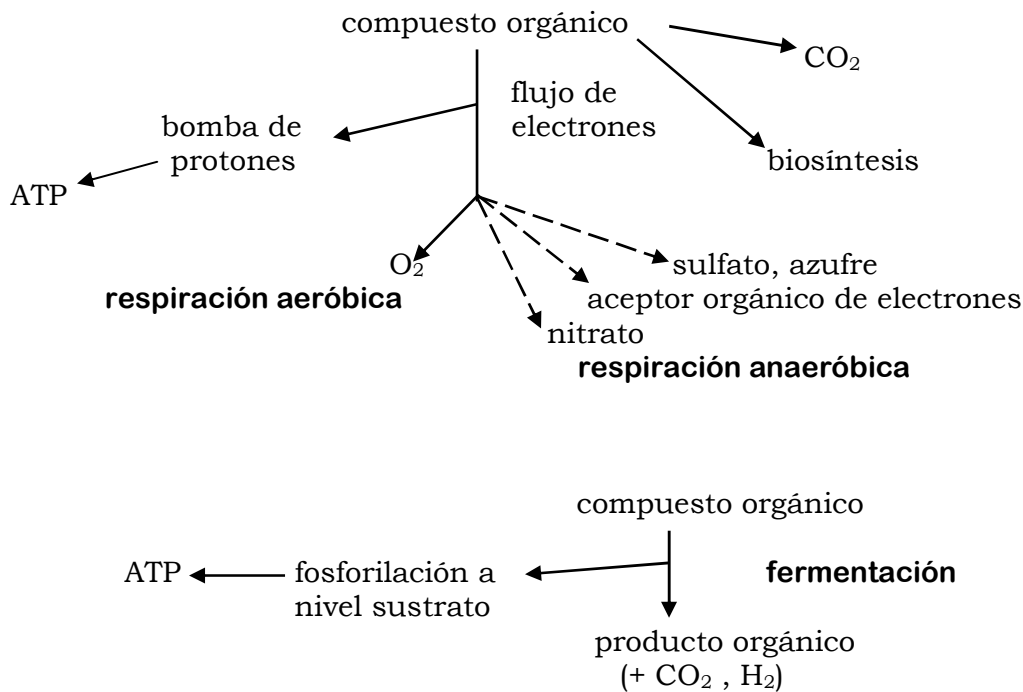
5.2. Metabolismo energético

Los microorganismos llevan a cabo diversos procesos destinados a obtener energía y nuevo material celular para su crecimiento y multiplicación. Los fototróficos son capaces de utilizar la energía de la luz para convertir el CO_2 en materia orgánica celular. Los quimiolitotróficos fijan el CO_2 con una fuente química de energía y los heterotróficos necesitan sustratos orgánicos para sus actividades metabólicas (4).

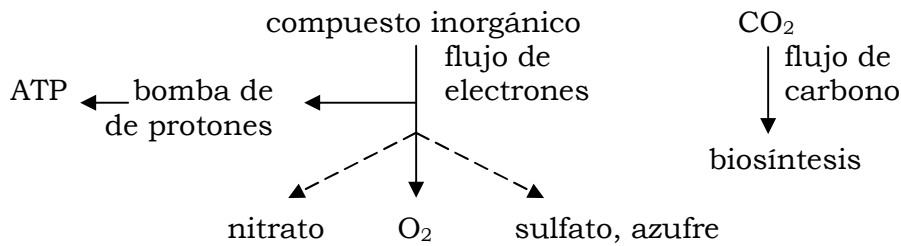
La energía requerida para el mantenimiento de la vida y la síntesis de los componentes celulares es obtenida por la transformación ordenada de las sustancias que ingresan a la célula. Éstas son modificadas por una serie de reacciones enzimáticas sucesivas, a través de las rutas metabólicas específicas que tienen la función de proveer los precursores de los componentes celulares y obtener energía para los procesos de síntesis y otros que la requieran.

El crecimiento aeróbico capacita a algunos organismos para oxidar completamente una fracción del sustrato orgánico y extraer así la máxima energía para convertir el resto del mismo en masa celular. Si el objetivo del cultivo microbiano es aumentar la biomasa, por ejemplo en la producción de levadura de panadería, resulta una ventaja obvia tener un crecimiento aeróbico con utilización completa del sustrato por respiración. Primero los nutrientes son rotos en pequeños fragmentos durante el catabolismo y luego convertidos por las reacciones del metabolismo intermediario en ácidos orgánicos y ésteres de fosfato (5).

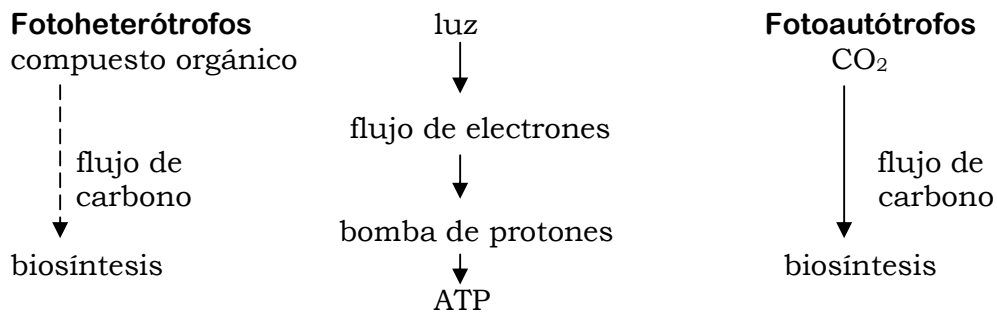
METABOLISMO HETEROTRÓFICO



METABOLISMO QUIMIOAUTOTRÓFICO



METABOLISMO FOTOTRÓFICO



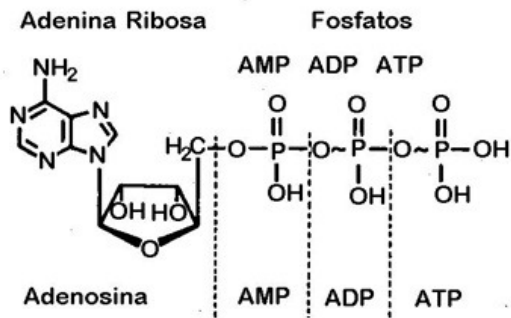
La mayoría de los compuestos de bajo peso molecular que representan las unidades para sintetizar la célula, son aminoácidos, bases púricas y pirimidínicas, fosfatos de azúcares, ácidos orgánicos y otros metabolitos, algunos producidos al final de largas cadenas de reacciones. Estas sustancias sirven para la síntesis de las macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, materiales de reserva, polímeros de la pared celular) durante el anabolismo (4).

Dentro de los organismos aeróbicos estrictos están muchas bacterias y casi todos los mohos y las actinobacterias. Los anaeróbicos estrictos están representados por miembros del género *Clostridium*, tal como *C. pasteurianum* que es un fijador de nitrógeno. Las levaduras y las enterobacterias, que pueden respirar o fermentar los sustratos, son organismos facultativos. Las bacterias lácticas pertenecen al grupo que obtiene su energía exclusivamente de la fermentación y no son afectados por una reducida presión parcial de oxígeno (microaerófilos).

El metabolismo anaeróbico es siempre menos eficiente que la respiración, ya que la fermentación no aprovecha toda la energía del sustrato orgánico (por ejemplo, un azúcar) para la producción del combustible universal de la célula (el ATP) ni, por tanto, para la síntesis de material celular. Las células excretan el producto de degradación que, a su vez, podría ser oxidado a CO₂ y H₂O por otros organismos (5).

Son varias las rutas metabólicas fermentativas. Las levaduras pueden fermentar una molécula de glucosa o fructosa, produciendo dos de etanol y dos de CO₂. En cambio las bacterias se pueden agrupar en dos tipos generales, homofermentativas con un producto principal y heterofermentativas dando dos o más. Los metabolitos de estos procesos no

pueden ser metabolizados en condiciones anaeróbicas, por el organismo que los produce.



En las fermentaciones el ATP es producido por fosforilación a nivel de sustrato, pues se sintetiza durante el catabolismo del compuesto fermentado (4).

Figura 5.3. Adenosin-trifosfato (6)

5.3. Fermentaciones

5.3.1. Fermentaciones lácticas

Las lactobacterias llevan a cabo este tipo de fermentación ausencia de aire o en presencia de concentraciones reducidas de oxígeno. El ambiente natural de lactobacterias es la leche y los lugares donde es procesada (*Lactobacillus delbrueckii* var. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis*), la superficie de las plantas intactas o podridas (*Lactobacillus plantarum*, *L. delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides*), así como el tracto intestinal y las mucosas de los animales (*Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*). Por tal motivo suele encontrarse cultivos puros naturales, como en algunos productos lácteos o material ensilado (6).

Las bacterias homo-fermentativas (por ejemplo *Lactobacillus casei*) producen lactato puro o casi puro, metabolizando la glucosa por vía de la fructosa-difosfato y reduciendo el piruvato a lactato. Según las especies se forma D(-), L(+) o DL-lactato. Las bacterias heterofermentativas (*Lactobacillus brevis*) degradan la glucosa al comienzo por la vía de las

pentosas y luego transforman el acetil-fosfato en etanol o acetato y el piruvato en lactato (4).

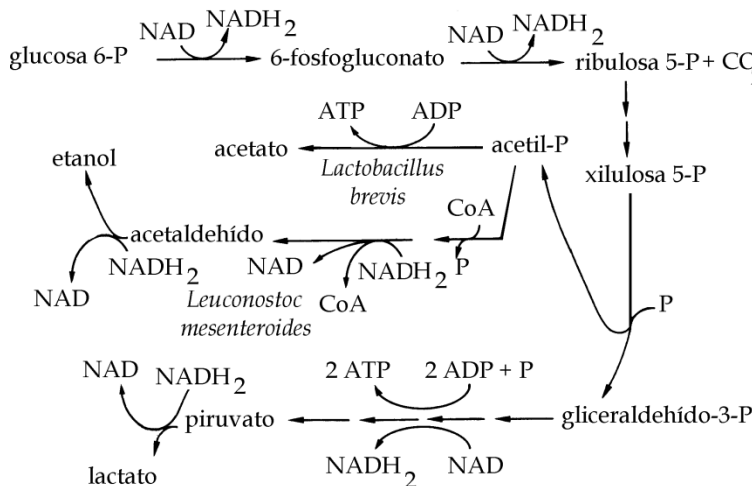


Figura 5.4. Fermentación heteroláctica (7)

Las bacterias lácticas son imprescindibles en la industria lechera como productores de ácido para la coagulación de la caseína en ciertos quesos, y aroma por la formación de diacetilo en algunas especies. También se emplean lacto-bacterias en la producción de salames pues la acidificación

contribuye a la conservación de estos embutidos, junto a la formación de bacteriocinas (6).

Como las bacterias lácticas siempre están presentes en pequeña cantidad en la filosfera se puede conservar forraje verde por acidificación mediante la fermentación espontánea. El llenado del silo debe ser homogéneo con un empaquetado denso, sino en los espacios libres desarrollarán hongos que degradan el material vegetal y producen micotoxinas. Si el forraje tiene un peso seco mayor que 30% tiene que ser humedecido por riego.

Al comienzo, cuando todavía hay oxígeno en el silo, éste es consumido por las células vegetales aún vivas y los microorganismos (levaduras, mohos y bacterias aerobias). El calor generado por el metabolismo microbiano no debe aumentar la temperatura al punto de dañar a las bacterias lácticas. La obtención de un desarrollo rápido de las especies de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. brevis* y otros) depende de la temperatura, humedad y densidad del empaquetamiento. Eventualmente se suele agregar un preparado con lactobacilos o inhibidores fúngicos como ácido sórbico o propiónico al 0,1-0,2%.

Las bacterias se multiplican produciendo los ácidos láctico, acético y succínico en una proporción de 1,5-2%, 0,5% y 0,1-0,2% en peso de forraje seco, respectivamente. El ensilado alcanza un pH de 4,0-4,2 y puede conservarse varios meses en ausencia de aire. El forraje verde así acidificado tiene características parecidas al que ha sido fermentado en el rumen, donde se forman ácidos orgánicos (acético y otros), siendo por lo tanto aceptado por el ganado (8).

5.3.2. Fermentaciones propiónicas

La formación de propionato, por las especies de *Propionibacterium* es utilizada en la maduración de quesos tipo suizo. El piruvato proveniente de la ruta de la fructosa-difosfato o el lactato resultante de otras fermentaciones son reducidos mediante la vía de la metilmalonil-CoA (6).

La producción de propionato debida a *Clostridium propionicum* y *Bacteroides ruminicola* ocurre por una ruta más simple, donde la lactil-CoA se reduce a propionil-CoA. Estas bacterias habitan el rumen y el intestino del ganado (4).

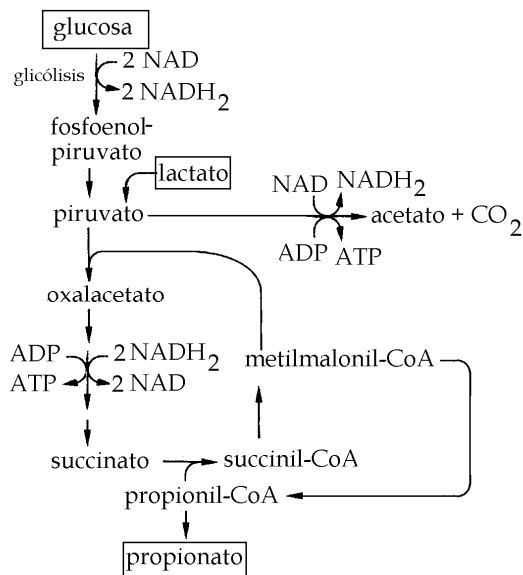


Figura 5.5. Fermentación por *Propionibacterium* (7)

5.3.3. Fermentación ácida-mixta

La fermentación ácida-mixta es llevada a cabo por *Escherichia coli* (bacteria facultativa del intestino) y otras patógenas de animales (*Salmonella* spp.) con la excreción de ácidos orgánicos. El pH desciende a 4,2, punto en el que la solución de rojo de metilo tiene color rojo (7).

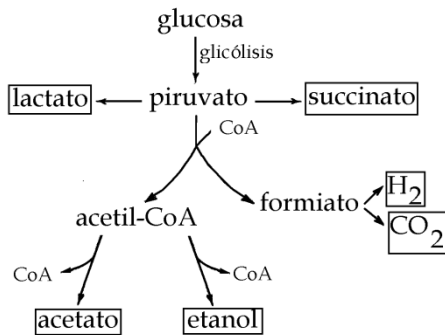


Figura 5.6. Fermentación ácida-mixta (7)

5.3.4. Fermentación butanodiólica

La fermentación butanodiólica es llevada a cabo por bacterias que se encuentran en el agua y el suelo (por ejemplo *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus* y la fitopatógena *Erwinia*) con la formación 2,3-butanodiol como producto principal. La acetoina es un intermediario que da positiva la reacción de Voges-Proskauer con α -naftol en medio alcalino, útil para detectar algunos organismos con este tipo de fermentación (7).

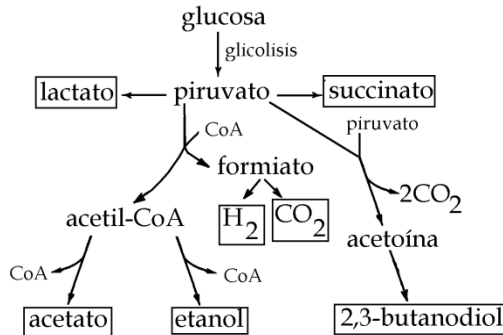


Figura 5.7. Fermentación butanodiólica (7)

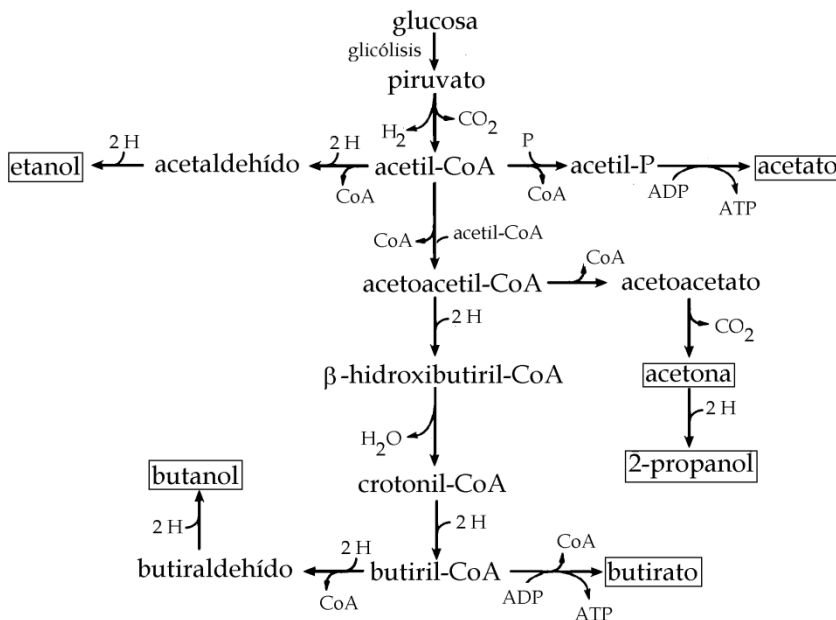


Figura 5.7. Fermentaciones por clostridios butíricos (7)

5.3.5. Fermentación butírico-butanólica

La fermentación butírico-butanólica de los clostridios comienza por la conversión de los azúcares en piruvato a través de la vía de la fructosa-difosfato. El piruvato es descarboxilado dando acetil-CoA y la transformación de este último origina varios productos (6). En las primeras fases predominan los ácidos butírico y acético pero luego, al bajar el pH del medio comienzan a acumularse acetona y butanol que son neutros (4).

5.3.6. Fermentaciones acéticas

Algunas bacterias anaeróbicas, como *Clostridium thermoaceticum*, fermentan la glucosa por la vía de la fructosa-difosfato. Luego generan acetato por descarboxilación del piruvato. La conversión del CO₂ e hidrógeno en acetato es llevada a cabo por organismos tales como *Acetobacterium woodii* y *Clostridium aceticum* (6).

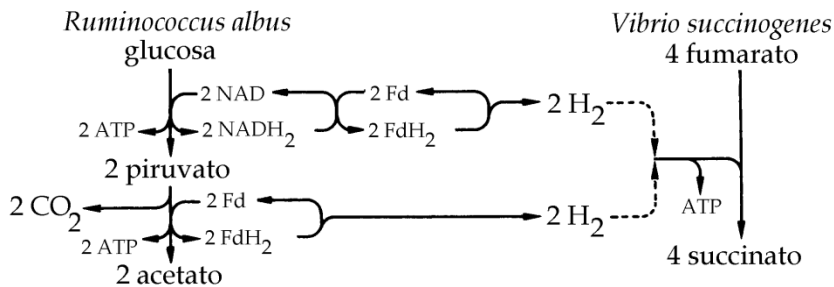


Figura 5.8. Fermentación acética por bacterias sintróficas ruminales (7)

5.3.7. Fermentación de aminoácidos y purina

Clostridium sporogenes y otros varios clostridios obtienen energía fermentando aminoácidos con producción de acetato, amonio e hidrógeno. Algunos fermentan pares de aminoácidos, donde uno actúa como dador de electrones y es oxidado, y el otro como aceptor de electrones y es reducido, en un proceso conocido como reacción de Stickland. También hay clostridios que fermentan adenina o xantina, dando acetato, formato, CO₂ y amonio (6).

5.3.8. Fermentación alcohólica

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* y otras forman etanol vía la fructosa-difosfato y descarboxilación del piruvato. El rendimiento energético es 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa fermentada. La bacteria *Zymomonas mobilis* metaboliza la glucosa por la ruta del ceto-desoxi-fosfogluconato y descompone el piruvato en CO₂ y acetaldehído, que luego es reducido a etanol (6). La fermentación con levaduras se emplea para la producción de bebidas y etanol industrial.

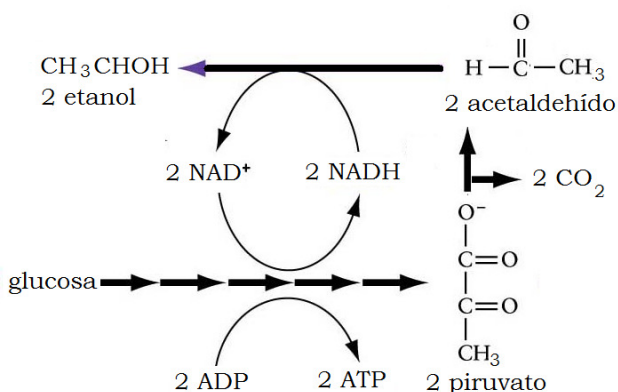


Figura 5.9. Fermentación alcohólica (7)

5.3.8.1. Levaduras

Las levaduras pueden oxidar en aerobiosis los monosacáridos, como la glucosa y la fructosa, hasta dióxido de carbono y agua formando ATP, NADH y radicales carbonados intermedios en la biosíntesis celular. Algunas son aerobias estrictas pero otras en condiciones de anaerobiosis pueden fermentar los azúcares produciendo etanol, aunque esta vía metabólica produce mucho menos ATP. Para que los azúcares penetren en la célula es necesario un transportador en la membrana citoplasmática. Los disacáridos, como la sacarosa, son hidrolizados en el exterior de la membrana (4).

Las levaduras usadas industrialmente consumen como máximo un 10% de sustrato por vía oxidativa, pues prefieren la fermentación. Entre ellas se encuentran algunas especies de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Brettanomyces* y *Candida*, las que consumen rápidamente la glucosa. Pero otras utilizan lentamente el 70% del azúcar en aerobiosis, como las especies de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* y la mayor parte de *Pichia*.

En ciertas levaduras simultáneamente hay una pequeña producción de ácido acético, como en el caso de *Brettanomyces* y *Zygosaccharomyces bailii*, o de glicerol, como ocurre en algunas especies de *Saccharomyces*. Unas pocas levaduras de los géneros *Pachysolen*, *Pichia* y *Candida* fermentan xilosa generando etanol (9).

Durante la fermentación las levaduras pueden producir alcoholes superiores (fusel-oil) tales como isobutanol e isopentanol, a consecuencia de la desaminación y descarboxilación de aminoácidos (25).

5.3.9. Fermentaciones ruminales

Las reacciones químicas que ocurren en el rumen requieren la actividad combinada de una variedad de microorganismos entre los que predominan las bacterias anaerobias estrictas, dado que el potencial de reducción es de -0,4 V y la concentración de O_2 a ese potencial es 10^{-22} M.

Fibrobacter y *Ruminococcus* son las bacterias celulolíticas más abundantes del rumen, pero también degradan xilano. *Fibrobacter* posee una celulasa periplásmica (entre la membrana citoplasmática y la membrana externa) por lo que debe permanecer adherido a la fibrilla de celulosa mientras la digiere, en cambio *Ruminococcus* produce una celulasa que es secretada. Los *Ruminobacter* y *Succinomonas* amilolíticos se encuentran en minoría, así como *Lachnospira* que digiere pectinas. Los productos de fermentación de estas y otras bacterias son utilizados por otros microorganismos. El succinato se convierte en propionato y CO_2 , y el lactato es fermentado a acetato y otros ácidos por *Megasphaera* y *Selenomonas* (4).

El H_2 producido en el rumen durante los procesos fermentativos nunca se acumula, ya que es utilizado rápidamente por los metanógenos (*Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium*) para reducir CO_2 a CH_4 . Otra fuente de H_2 y CO_2 es el formiato. La composición media de los gases acumulados en el rumen es aproximadamente 65% CO_2 y 35% CH_4 . El acetato no llega a convertirse en metano dentro del rumen debido a que el tiempo de digestión del material ingerido es demasiado corto para que puedan desarrollarse los organismos acetotróficos y además las bacterias

sintróficas degradadoras de ácidos grasos no abundan pues éstos son quitados del sistema hacia la sangre del animal (6).

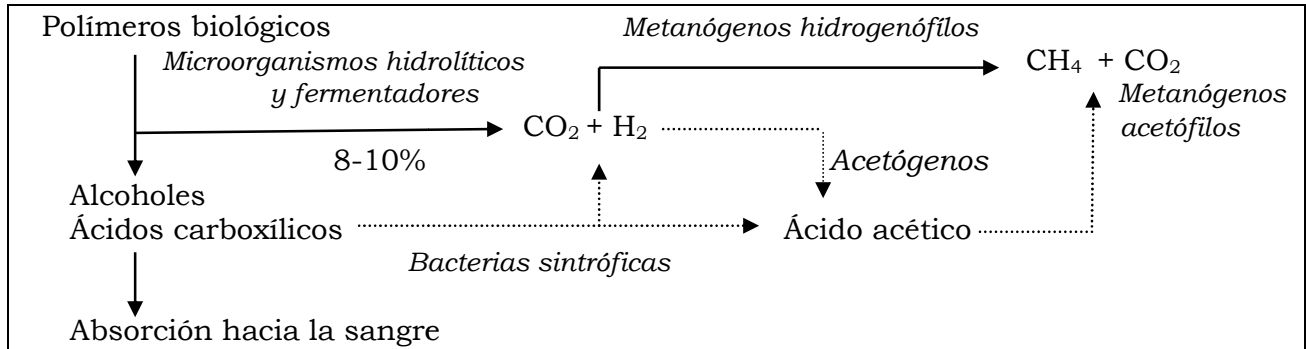
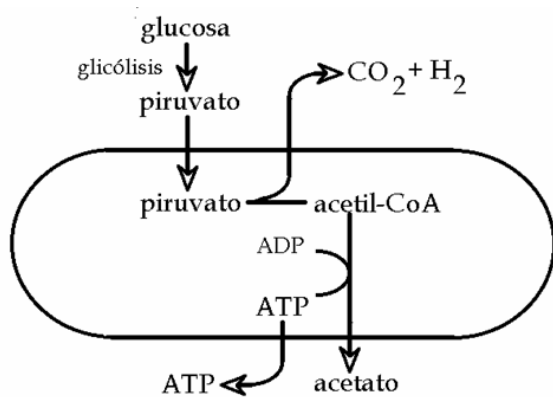


Figura 5.10. Fermentaciones ruminales (10)



Los protozoos anaeróbicos con metabolismo estrictamente fermentativo carecen de mitocondrias y contienen hidrogenosomas donde el piruvato proveniente de la glicólisis es oxidado con producción de acetato, CO_2 e H_2 y la ganancia adicional de ATP. El hidrógeno es aprovechado por metanógenos intracelulares (4).

Figura 5.11. Hidrogenosoma (izquierda) (4)

Los hongos anaeróbicos *Neocallimastix*, *Orpinomyces* y *Piromyces* también contienen hidrogenosomas. Las esporas de *Neocallimastix* tienen un número inusual de flagelos pero son inmóviles cuando se enquistan y luego al germinar, adheridos al material vegetal al que penetran mediante rizoides. Degradan celulosa, xilanos, pectinas y almidón dando acetato, formato, lactato, CO_2 e H_2 . Éste es aprovechado por los metanógenos asociados a la superficie del hongo (11).

5.4. Respiración

5.4.1. Producción de piruvato

La glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato cuando ingresa a la célula. Luego es convertida en piruvato, uno de los compuestos intermediarios más importantes del metabolismo. La principal vía metabólica es la ruta de la fructosa-1,6-difosfato o glicólisis cuyo balance muestra la formación de dos moléculas de ATP, energía química almacenada por fosforilación a nivel de sustrato, y dos del transportador de hidrógeno NADH_2 (nicotinamida-adenin-dinucléotido).

Otra es la ruta oxidativa de la pentosa-fosfato, la cual además provee ribosa-fosfato para la síntesis de nucleótidos. Estas vías también son utilizadas por los microorganismos fermentadores. La ruta del ceto-desoxi-fosfogluconato se observa en una variedad de bacterias Gram-negativas (6), pero en muy pocos hongos. La oxidación del piruvato se produce por

caminos distintos según los organismos dando acetyl-CoA que entra en ciclo del citrato (24).

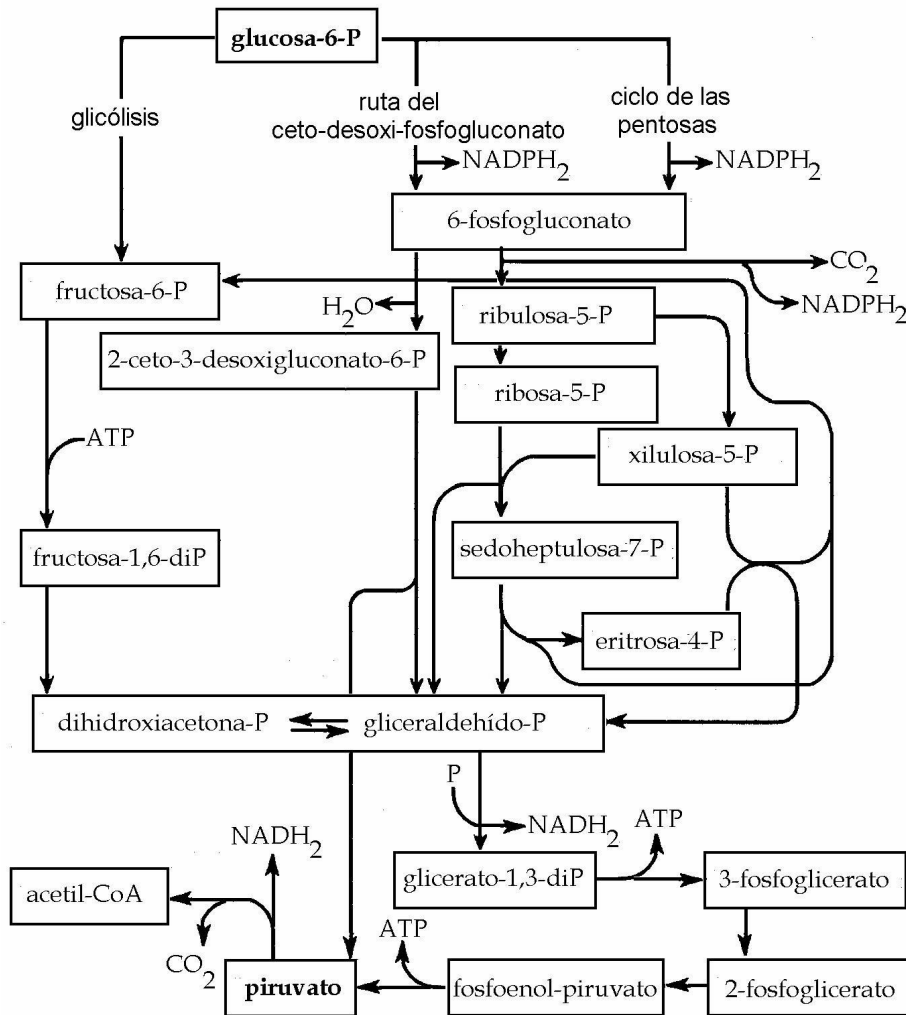


Figura 5.12. Rutas para la producción de piruvato (12)

5.4.2. Ciclo del citrato

Este ciclo completa la oxidación de los nutrientes generando CO₂ e hidrógeno, transportado éste por NADH₂, NADPH₂ (nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato) ó FADH₂ (flavin-adenin-dinucleótido), y además GTP (guanosin-trifosfato). También provee precursores para la biosíntesis.

Este ciclo es también la vía final para la oxidación de las cadenas carbonadas de los aminoácidos, después de la desaminación, y de la acetyl-CoA proveniente de la degradación de los ácidos grasos (4). El piruvato formado en el citoplasma de la célula fúngica es transportado a la mitocondria donde es convertido en acetyl-CoA e introducido en el ciclo (24).

5.4.3. Cadena respiratoria

Es llamada también cadena de transporte de electrones. En los eucariotas las enzimas de la respiración están en unos orgánulos denominados mitocondrias mientras que en los organismos procarióticos se encuentran en la membrana citoplasmática. La energía representada en la forma de coenzimas reducidas es recuperada como ATP a través de la cadena de

transporte de electrones y el bombeo de protones del interior al exterior de la membrana citoplasmática en los procariontes (4), o desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana en los eucariotes (24).

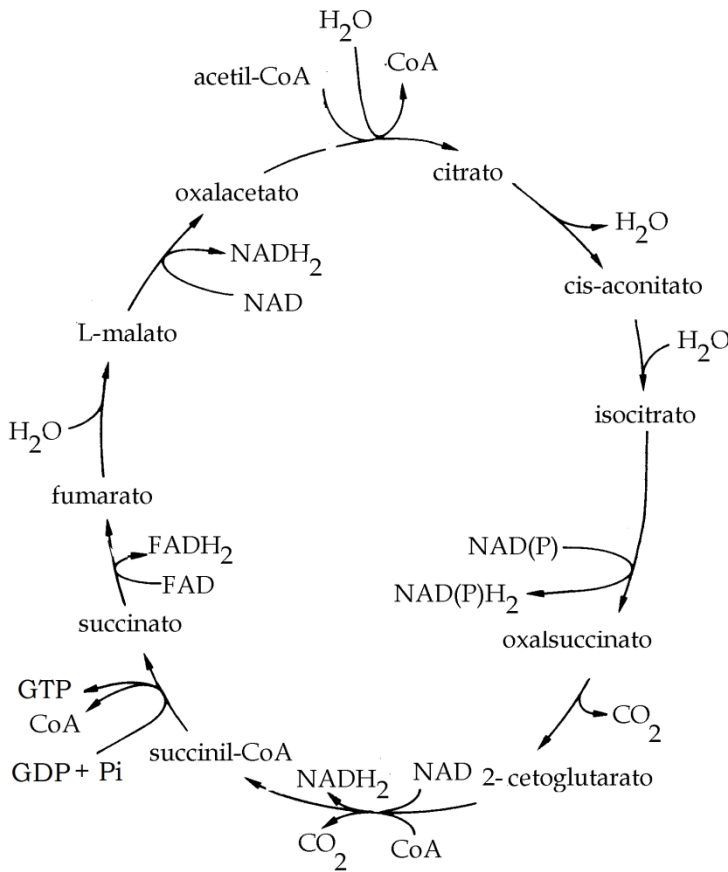


Figura 5.13. Ciclo del citrato (4)

La secuencia del transporte de electrones en la membrana va desde la flavoproteína hasta el O_2 u otro aceptor terminal, mientras que los H^+ son bombeados fuera. Cuando el oxígeno se reduce, requiere protones del citoplasma para completar la reacción, los que se originan por la disociación del agua. El resultado neto es un gradiente de protones y un potencial electroquímico a través de la membrana, con una carga negativa en la parte interna y positiva en la externa. Este estado energizado de la membrana se expresa como fuerza motriz de protones.

La energía puede ser usada directamente en el transporte de iones, la rotación de los flagelos o la producción de los

enlaces fosfato del ATP a través del sistema ATPasa (fosforilación oxidativa) anclado en la membrana. La respiración provee 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa oxidada (4).

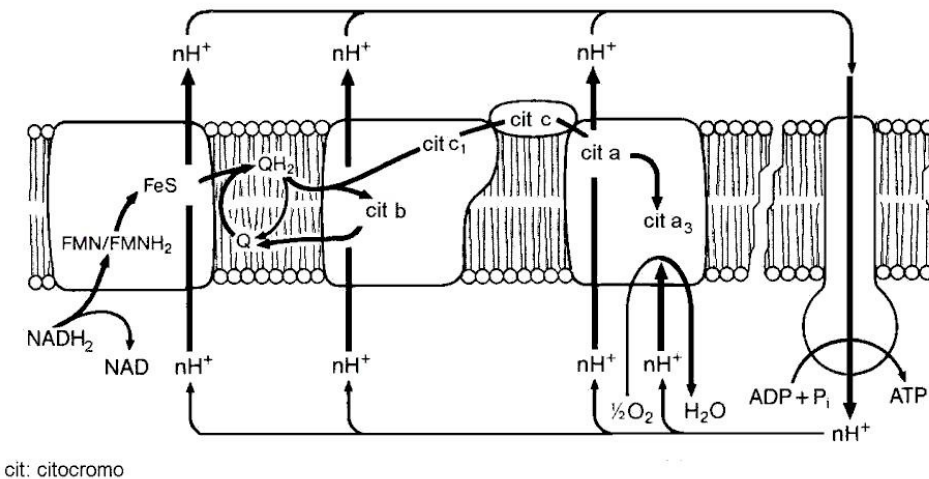


Figura 5.14. Transporte de electrones en la membrana bacteriana durante la respiración (FMN: flavin-mononucleótido; FeS: ferro-sulfo-proteína; cit: citocromo; Q: quinona) (6)

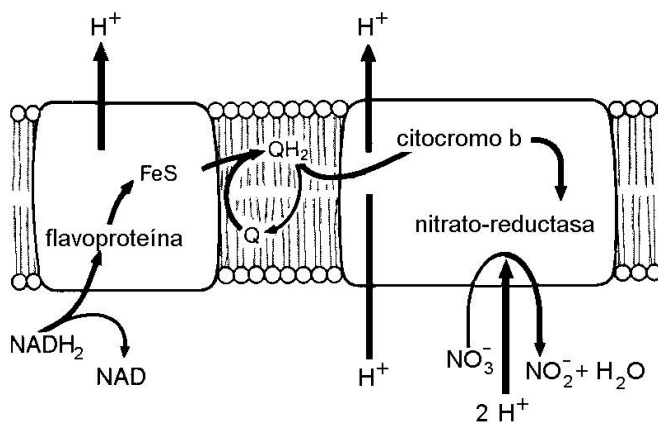
5.4.4. Otras oxidaciones

No todas las reacciones oxidativas catalizadas por microorganismos aeróbicos estrictos llegan hasta CO_2 y agua, tal el caso de la conversión de etanol en ácido acético debida a especies de *Acetobacter*. Aunque esta oxidación incompleta provee energía en forma de ATP, generalmente los organismos no pueden conseguir moléculas para su crecimiento a partir de tales reacciones y requieren otros nutrientes.

La oxidación de los ácidos grasos (ver figura 3.16) ocurre por un proceso llamado β -oxidación que forma comúnmente acetil-CoA, pues la mayoría de los ácidos naturales constituyentes de los lípidos tienen un número par de carbonos. El acetil-CoA es oxidado en el ciclo del citrato y en el caso del ácido palmítico con 16 carbonos se puede llegar a generar hasta 129 moléculas de ATP (4).

5.5. Respiración anaeróbica

Es una variación de la respiración en la que los aceptores de electrones utilizados son diferentes al oxígeno, e incluyen nitrato, ión férrico, sulfato, carbonato y ciertos compuestos orgánicos. Los productos de la respiración anaeróbica son fácilmente detectados por las burbujas de N_2 , NO_2 y CH_4 (inflamable), el olor de H_2S o la formación de óxido de hierro diamagnético



(2).

Figura 5.15. Transporte de electrones en la respiración anaeróbica (6)

5.5.1. Desnitrificación

La desnitrificación transitoria y localizada en los suelos consiste en la reducción anaeróbica del nitrato a compuestos volátiles (N_2 , N_2O , NO). Es producida por bacterias que respiran y solamente pueden crecer anaeróbicamente en presencia de nitrato, tal el caso de *Pseudomonas stutzeri* y *Paracoccus denitrificans*. Ocurre con frecuencia en los suelos anegados, especialmente cuando se aplicaron juntos fertilizantes orgánicos y nitrato (12). Algunos hongos, por ejemplo *Fusarium oxysporum*, pueden utilizar nitratos o nitritos como aceptores terminales de electrones en la respiración anaeróbica (11).

5.5.2. Reducción a nitritos

Algunas bacterias facultativas como *Enterobacter* y *Escherichia*, pueden respirar reduciendo el nitrato a nitrito, que se acumula en el ambiente,

pero no producen N_2 . Luego reducen el nitrito a amonio por la vía asimilatoria, si hay deficiencia de NH_4^+ en el medio (6).

Microbios desnitrificantes

Inocular, sin agitar, unos gránulos de suelo en los tubos de los medios estériles e incubar una semana a $30^\circ C$. Si se ha reducido el nitrato hasta el estado de nitrógeno molecular u óxido de nitrógeno quedarán retenidos en las campanitas inmersas en los tubos. Detectar la formación de nitritos agregando 0,5 mL del reactivo de Griess A y 0,5 mL del B a cada tubo, aparecerá un color rosado.

El medio mineral contiene: nitrato de potasio 20 g, fosfato dipotásico 500 mg, sulfato de magnesio 200 mg, acetato de sodio 10 g, agua corriente 1 L, pH 7.

El medio complejo contiene extracto de carne 1 g, peptona 5 g, extracto de levadura 2 g, cloruro de sodio 15 g, nitrato de potasio 10 g, agua 1 L, pH 7.

Reactivo de Griess: A) Disolver 0,05 g de naftilamina en 100 mL de ácido acético al 30% en agua. B) Disolver 0,32 g de ácido sulfanílico en 100 mL de ácido acético al 30% en agua (13).

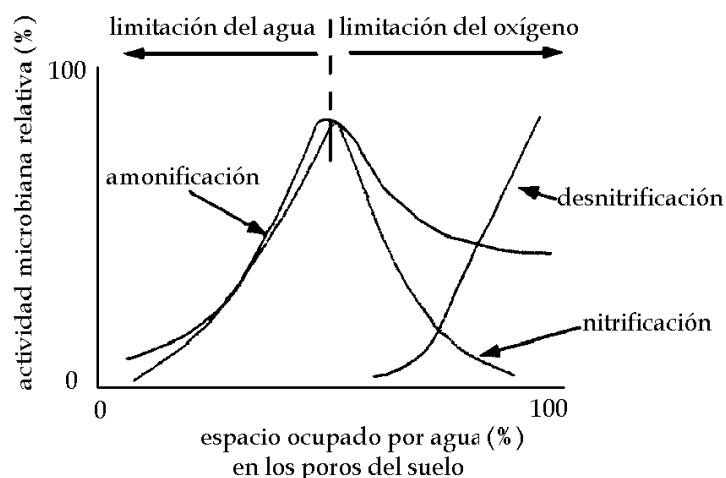


Figura 5. 16. Actividad relativa de las bacterias en el ciclo del nitrógeno (2)

5.5.3. Reducción de sulfatos

Es la transferencia de hidrógeno al sulfato aceptor terminal de electrones en la respiración anaeróbica, reduciéndolo a H_2S . Este proceso, llamado también reducción desasimilatoria de sulfatos, es cumplido por bacterias anaeróbicas obligadas tales como *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*. Los donantes de hidrógeno son lactato, acetato, etanol y otros.

Microbios reductores de sulfato

Sembrar, sin agitar, unos gránulos de suelo en el tubo de medio estéril y adicionar 0,5 mL de solución de sulfato ferroso amónico al 1% en agua estéril. Cubrir con agar al 1,5% fundido o vaselina estéril. Incubar tres o cuatro semanas a temperatura ambiente. Un color negro indica la formación de sulfuro de hierro.

El medio de cultivo contiene fosfato dipotásico 0,5 g, cloruro de amonio 1 g, sulfato de calcio 1 g, sulfato de magnesio 2 g, lactato de sodio (al 60% p/v) 6 mL, extracto de levadura 1 g, tioglicolato de sodio 1 g, agua corriente 1 L, pH 7,2-7,6. Colocar 10-15 mL en cada tubo (13).

Los microorganismos reductores de sulfato son responsables de la precipitación de Fe^{++} y otros cationes metálicos en aguas polutas, y la corrosión de metales enterrados. *Desulfuromonas* puede reducir el azufre elemental a H_2S . Por otra parte, casi todas las bacterias, así como los hongos pueden reducir sulfatos para sintetizar aminoácidos azufrados por la vía de la reducción asimilatoria de sulfatos (14).

5.5.4. Reducción de otros compuestos

Algunos compuestos orgánicos pueden participar como aceptores de electrones externos en la respiración anaeróbica, tal es el caso de fumarato que es reducido a succinato por *Wolinella succinogenes*.

El ión férrico es un aceptor de electrones para varios organismos quimiolitotróficos y quimioorganotróficos, como *Alternaria*, *Fusarium*, *Geobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Shewanella*. Los iones férrico y ferroso tienen propiedades de solubilidad muy diferentes y el Fe^{+++} precipita en ambientes neutros o alcalinos en forma de hidróxido férrico. También el hierro suele estar unido a compuestos orgánicos formando quelatos.

Shewanella puede reducir también Mn^{4+} a Mn^{++} cuando crece a expensas de acetato y otras fuentes carbonadas no fermentables (4). El manganeso es importante para la acción de las peroxidasas de los hongos lignívoros (14).

Otras bacterias suelen reducir selenato a selenito y aún a selenio elemental (15). *Desulfotomaculum* es capaz de reducir arsenato a arsenito simultáneamente con la reducción de sulfato a sulfuro lo que conduce a la precipitación de sulfuro de arsénico, siendo esta reacción un ejemplo de biomineralización (4).

5.6. Bacterias autotróficas

Estas bacterias usan CO_2 como fuente de carbono a través del ciclo de la ribulosa-difosfato o de Calvin, excepto las acetogénicas, metanogénicas y algunas fototróficas. Obtienen energía y moléculas reductoras usando iones amonio, nitrito, sulfuro, tiosulfato, sulfito o ferroso, así como azufre elemental, hidrógeno o monóxido de carbono. Tienen los componentes del transporte electrones como los heterótrofos y obtienen energía mediante la fuerza motriz de protones (6).

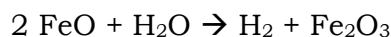
El basalto es una roca volcánica rica en hierro que está esencialmente desprovista de materia orgánica, pero en algunas formaciones se ha encontrado una gran cantidad de bacterias anaeróbicas quimiolitotróficas que incluyen sulfatorreductores, metanógenos y homoacetógenos (22). Estos anaerobios comparten una gran apetencia por el hidrógeno que es el donante de electrones para sus correspondientes metabolismos productores de energía (4).

Metanogénesis: $4 \text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$

Acetogénesis: $4 \text{H}_2 + 2 \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 4 \text{H}_2\text{O}$

Reducción de sulfato: $4 \text{H}_2 + \text{SO}_4^{= } + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4 \text{H}_2\text{O}$

El hidrógeno del basalto se origina de la interacción del agua con el mineral de hierro de las rocas (23).



5.6.1. Metanogénesis

El ecosistema donde ocurre la metanogénesis comprende pantanos, arrozales, sedimentos de lagos, estanques y estuarios, digestores de aguas residuales, el rumen y el intestino. En tales ambientes anaeróbicos los sustratos orgánicos son fermentados por diversos microorganismos a acetato, CO_2 e H_2 (ver figuras 5.9 y 7.1). Estos productos son utilizados por las arqueobacterias formadoras de metano, tal como *Methanomicrobium* y *Methanobrevibacter* que se encuentran en el rumen. Dado que el CO_2 es usado como un aceptor de hidrógeno generando energía, el proceso ha sido llamado respiración del carbonato.

Estas arqueobacterias son autotróficas, fijan CO_2 produciendo acetyl-CoA para la síntesis del material celular, la mayoría son mesófilas aunque hay algunas termófilas (4).

5.6.2. Nitrificación

En el curso de la degradación de sustancias nitrogenadas se libera amonio. La conversión del amonio a nitrito es llevada a cabo por las bacterias nitrificantes del suelo (*Nitrosolobus*, *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*) y el agua (*Nitrosococcus*). No hay bacterias que conviertan directamente el amonio en nitrato y el nitrito es oxidado a nitrato por las bacterias nitrificantes del suelo (*Nitrobacter*) y el mar (*Nitrococcus*, *Nitrospina*, *Nitrospira*). Estas bacterias son quimiolitotróficas obligadas y en solución mineral crecen con un tiempo de generación entre 10 y 20 horas, aunque algunas cepas son capaces de asimilar acetato o piruvato (4).

Microbios nitrificantes

Sembrar unos gránulos de suelo en un tubo con medio estéril para oxidantes de amonio y dos con el medio estéril para oxidantes de nitrito, e incubar a 25-27°C durante dos semanas.

Investigar la formación de nitritos mediante el reactivo de Griess en el tubo para oxidantes de amonio y en uno de los tubos para oxidantes de nitrito. Si en este último da negativo los microorganismos han oxidado todos nitritos a nitratos. Agregar al tercer tubo unos 50 mg de urea y 10 gotas de ácido sulfúrico, calentar para eliminar los nitritos si los hubiere y luego añadir 1 mL de reactivo difenilamina por las paredes y en la zona de contacto aparecerá un color azul.

El reactivo difenilamina contiene difenilamina 1 g, agua destilada 20 mL, ácido sulfúrico 100 mL y se coloca en frasco oscuro.

El medio de cultivo para oxidantes de amonio contiene: sulfato de amonio 1 g, fosfato dipotásico 0,5 g, cloruro de sodio 2 g, sulfato de magnesio 200 mg, sulfato ferroso 50 g, carbonato de calcio 6 g, agua corriente 1 L. Se distribuye en tubos de 30 mm de diámetro.

El medio para oxidantes de nitrito contiene nitrito de sodio 1 g, en lugar del sulfato de amonio (13).

Los iones amonio son oxidados rápidamente en los suelos bien aireados. La conversión de este catión al anión nitrito o nitrato, trae aparejado una acidificación del suelo con un incremento en la solubilización de minerales

(potasio, calcio, magnesio y fosfatos). Por tal motivo los microorganismos nitrificantes fueron vistos como un factor significativo de la fertilidad del suelo (15).

El proceso de nitrificación ocurre entre pH 7 y 8, por lo que los suelos alcalinos como los ácidos no son propicios para *Nitrobacter*. El amonio es mejor retenido que el nitrato, especialmente por la unión más o menos firme a los componentes ácidos del humus y la adsorción sobre arcillas. El nitrato, en cambio, es fácilmente eliminado por el agua acumulándose en las capas freáticas (6). Una concentración de nitrato mayor que 50 mg por litro de agua potable puede afectar la salud, pues las bacterias del intestino lo reducen y el nitrito pasa a la sangre uniéndose irreversiblemente a la hemoglobina (16).

Mientras que los organismos antes nombrados son aerobios estrictos, el microorganismo autotrófico *Brocadia* puede oxidar amonio con nitrito como aceptor de electrones, produciendo N₂ en condiciones anoxigénicas (proceso anammox). *Brocadia* pertenece a los Planctomycetes pues carece de peptido-glucano y posee en el interior compartimentos encerrados por membranas (4). Los oxidantes de amonio, tanto aerobios como anaerobios, conviven en ambientes tales como las aguas cloacales (3).

El uso de nitrito como aceptor final de electrones para la fijación de CO₂ produciendo nitrato ocurre tanto en *Brocadia* como en *Nitrobacter* (4).

5.6.3. Sulfooxidación

Los *Thiobacillus* son unas bacterias capaces de obtener energía por la oxidación de compuestos de azufre (sulfuro, azufre, tiosulfato) hasta sulfatos. La mayoría son autotróficos y dependen de la fijación de CO₂ como *T. thiooxidans*, *T. denitrificans*. Entre los heterotróficos se encuentran por ejemplo *T. novellus* y *Sulfolobus acidocaldarius*. Éste último es una arqueobacteria termófila de las aguas termales azufradas. *T. thiooxidans* es un organismo aerobico que produce ácido sulfúrico y tolera una solución 1 N del mismo.

El agregado de azufre permite neutralizar suelos calizos y reducir la incidencia de algunos patógenos vegetales debido a la acidificación provocada por los sulfo-oxidantes del suelo. *T. denitrificans* puede reducir nitratos anaeróbicamente pero no lleva a cabo una reducción asimilatoria y necesita la presencia de sales de amonio en el medio (2). La bacteria filamentosa *Beggiatoa* y la fototrófica *Chromatium* pueden oxidar sulfuros a azufre elemental que se acumula en la célula (4).

Microbios sulfooxidantes

Sembrar unos gránulos de suelo en un tubo de medio estéril e incubar a 25-27°C durante dos a tres semanas. Después acidificar con dos gotas de ácido clorhídrico concentrado y añadir 5 gotas de solución acuosa de cloruro de bario al 5% aparecerá de una opalescencia blanca de sulfato de bario.

El medio de cultivo contiene cloruro de amonio 100 mg, fosfato dipotásico 3 g, cloruro de magnesio 100 mg, cloruro de calcio 100 mg, tiosulfato de sodio 5 g, agua 1 L, pH 4,2 (13).

5.6.4. Ferrobacterias y otras oxidaciones

Las bacterias *Gallionella*, *Leptothrix*, *Thiobacillus ferrooxidans*, y también la arqueobacteria acidófila *Ferroplasma*, oxidan los iones ferrosos a férricos que precipitan en el agua como hidróxido férrico. *Gallionella* excreta un mucus que se impregna de hidróxido férrico formando una especie de pedúnculo.

La vaina de la bacteria filamentosa *Leptothrix* está recubierta de sales férricas u óxido de manganeso, pues puede oxidar Mn^{++} a MnO_2 (4). La oxidación del manganeso se produce a pH elevado en un suelo bien aireado con alto contenido de materia orgánica (14).

5.7. Biosíntesis

En el metabolismo normal, todos los compuestos que necesita la célula se sintetizan en la cantidad justa. Este control se realiza por una serie de reacciones reguladoras estrictas que detienen la formación de productos intermedios y finales de una ruta metabólica, cuando un compuesto dado alcanza una determinada concentración. Sin embargo, existen mutantes en los que el mecanismo de regulación es tan defectuoso que hay una sobreproducción de algunos metabolitos y los excretan al medio, lo que es aprovechado en la producción industrial (11).

5.7.1. Síntesis de aminoácidos y proteínas

Casi todos los organismos están capacitados para convertir el nitrógeno inorgánico en proteínas y ácidos nucleicos. El N puede ser asimilado en forma de iones amonio y por algunos microbios en forma de iones nitrato. Ningún moho o ni levadura fijan nitrógeno gaseoso como lo hacen algunas bacterias, tal el caso de *Azotobacter* que vive libre en el suelo y *Rhizobium* que crece como simbiote en los nódulos de las raíces de leguminosas. La asimilación del nitrógeno inorgánico implica una reducción a amonio antes de su incorporación al compuesto orgánico (17). Por otro lado, algunos hongos excretan al medio, como amonio, parte del contenido de nitrógeno de sus proteínas (24).

La mayoría de los organismos son capaces de sintetizar todos los aminoácidos requeridos para la síntesis de proteínas. El grupo amino es introducido por aminación directa de los cetoácidos (oxoglutarato, piruvato) o por transaminación que es la formación de un nuevo aminoácido a partir de glutamato y algunos otros.

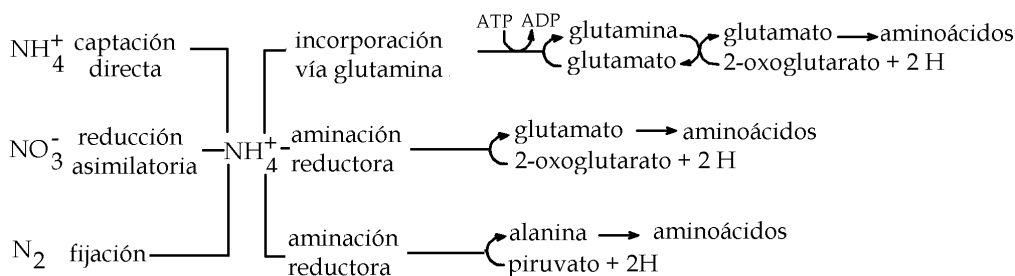
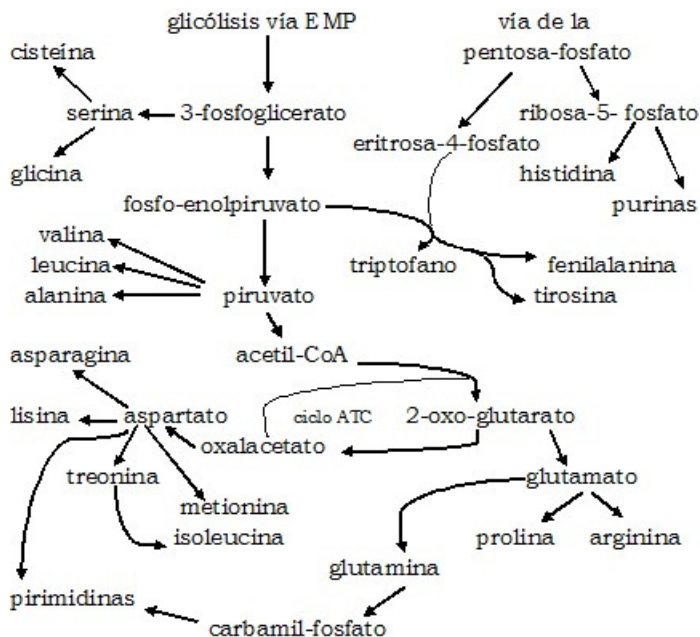
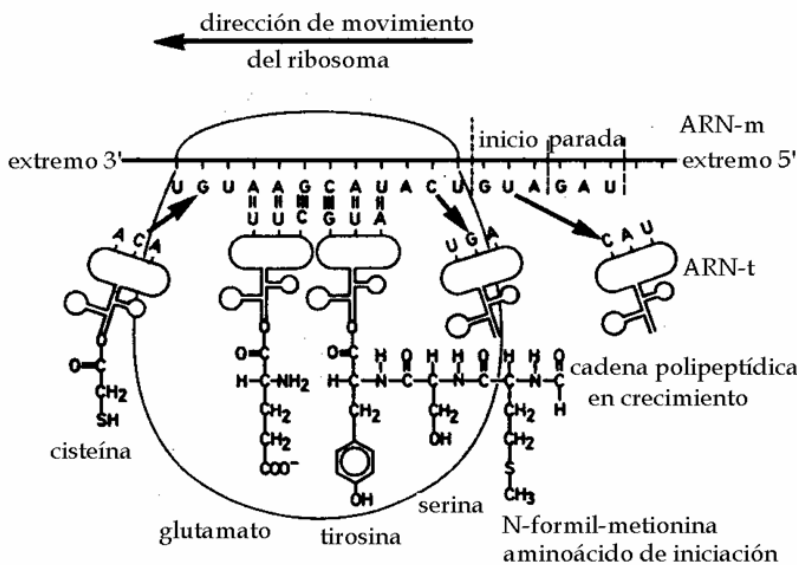


Figura 5.17. Vías de la incorporación del nitrógeno (6)



Para la síntesis de las proteínas, la información contenida en el ADN es transcrita en el ARN mensajero (ARN-m) monocatenario y los ARN de transferencia. El ARN-m llega a los ribosomas donde los aminoácidos son reunidos en una cadena polipeptídica, según la secuencia determinada por el mismo durante su traducción. La síntesis implica la participación de los ARN-t que aportan los aminoácidos específicos, además de varias enzimas y ATP (19).

Figura 5.18. a) Vías de síntesis de aminoácidos, purinas y pirimidinas (24) ; b) Síntesis de proteínas (18)



5.7.2. Síntesis de nucleótidos

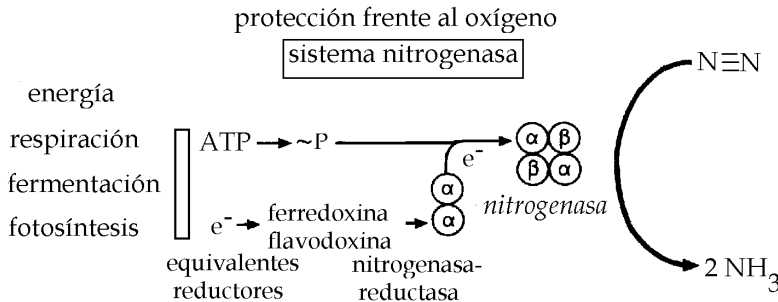
Las purinas y pirimidinas que constituyen los nucleótidos son construidas a partir de varios precursores. La ribosa necesaria para la síntesis del ARN se obtiene del ciclo de las pentosas. Una vez formados los ribonucleótidos, una reductasa los convierte en los desoxirribonucleótidos para la síntesis del ADN (4).

5.7.3. Fijación de N₂

La reacción química responsable del proceso de fijación consiste en la transferencia de seis electrones al N₂ para dar NH₄⁺ con el aporte de energía en forma de ATP. La reacción debe estar acoplada a la fermentación o a la respiración de azúcares u otros compuestos energéticos, o bien a la

fotofosforilación del ADP, para que transcurra espontáneamente. Los electrones son provistos a través de la ferredoxina y la flavodoxina. El sistema nitrogenasa está constituido por dos enzimas, la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa. La primera posee dos unidades de un cofactor que contiene átomos de hierro y molibdeno. La dinitrogenasa reductasa tiene un cofactor sulfoférrico. Algunos organismos sintetizan una nitrogenasa alternativa con vanadio cuando hay una carencia de molibdeno en el suelo (6). La nitrogenasa también puede reducir otros compuestos como el acetileno, lo que proporciona un método de medida de la actividad de los sistemas fijadores de nitrógeno.

Figura 5.19. Reducción del nitrógeno (6)



En la fijación simbiótica, la expresión de la nitrogenasa en los bacteroides se modifica por diversos factores aportados por la planta. La enzima se inhibe en presencia de nitrógeno combinado y cesa cuando comienza el desarrollo de las semillas en la planta hospedante (senescencia de los nódulos). Otro factor que afecta la fijación es la temperatura del suelo. Dada la rápida inactivación de la nitrogenasa en presencia de oxígeno, los organismos fijadores de vida libre han desarrollado diversas estrategias para evitarla: una alta tasa respiratoria, la formación de estructuras protectoras, la compartimentación celular o el crecimiento en condiciones anaeróbicas o microaerofílicas (20).

Las cianobacterias filamentosas son tolerantes al oxígeno ambiental debido a que la actividad nitrogenasa se localiza generalmente en una célula especial, llamada heterocisto. Éste posee una pared poco permeable al oxígeno y pueden generar ATP por fotofosforilación cíclica y fosforilación oxidativa, con lo cual se eliminan las trazas de O_2 . Los transportadores de hidrógeno necesarios para la fijación provienen de las otras células fototróficas (4).

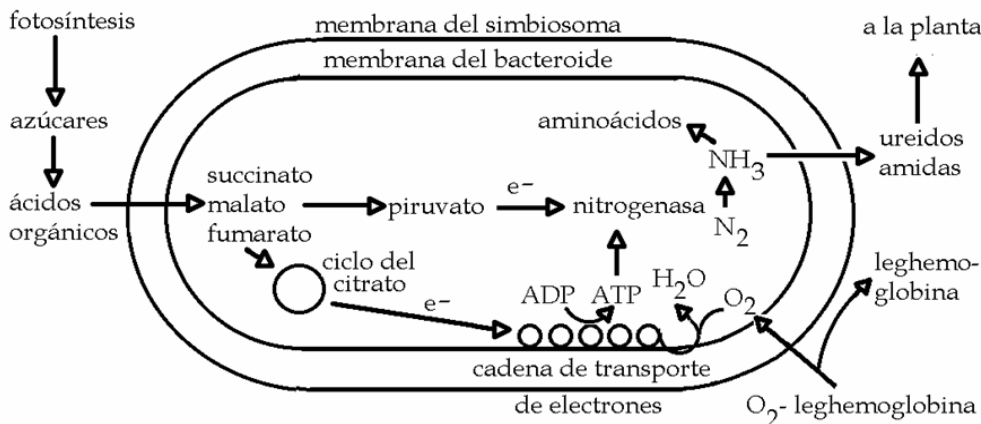
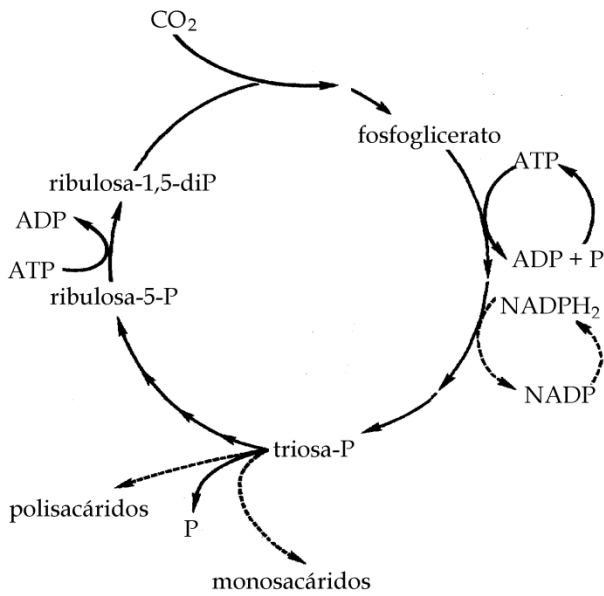


Figura 5.20. Fijación de nitrógeno en un bacteroide (4)

5.7.4. Fijación de CO₂ y síntesis de glúcidos



Muchas bacterias autotróficas y fototróficas, así como las cianobacterias y las plantas, fijan CO₂ como única fuente de carbono a través del ciclo de la ribulosa-difosfato o de Calvin. Pero las metanogénicas y acetogénicas, que también son autotróficas, lo hacen por la vía reductora del acetil-CoA, mientras que las bacterias verdes del azufre fijan CO₂ por el ciclo del citrato inverso (6).

Figura 5.21. Fijación de CO₂ en el ciclo de la ribulosa-diP (6)

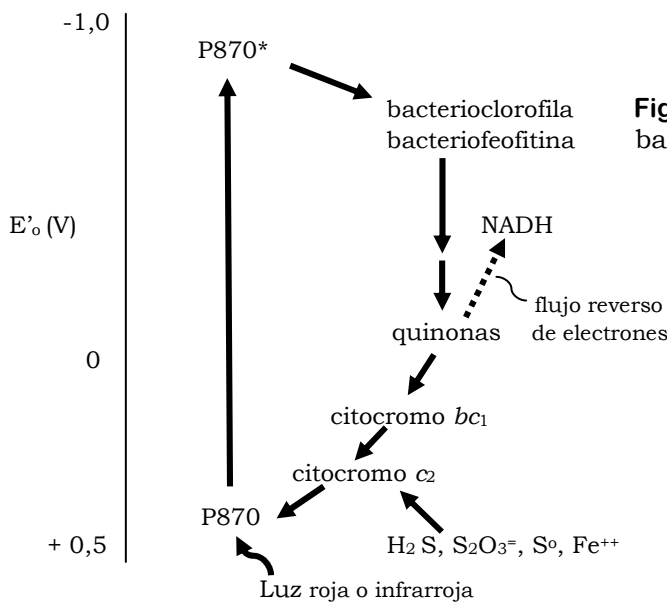


Figura 5.22. Flujo cíclico de electrones en las bacterias púrpura (4)

La actividad de los pigmentos en la fotosíntesis de las bacterias no libera oxígeno como ocurre con las cianobacterias y las plantas. Hay dos tipos de bacterias de color púrpura (rojo o pardo) porque contienen carotenoides, uno comprende a las anaeróbicas, por ejemplo *Chromatium* dependiente del azufre y *Rhodospirillum* no dependiente, y otro a las aeróbicas como *Erythromonas*. En cuanto a las verde, algunas, por ejemplo *Chlorobium*, utilizan H₂S como dador de electrones y otras, por ejemplo *Chloroflexus*, no. También hay bacterias fototróficas Gram-positivas, anaeróbicas y esporuladas, por ejemplo *Heliobacterium* frecuente en suelos tropicales anegados. Cualquiera sea el mecanismo de captación de la luz y transporte de electrones, se genera una fuerza motriz de protones que permite sintetizar ATP (fotofosforilación) (21).

La bacteriorrodopsina de la arqueobacteria *Halobacterium* se transforma por absorción de luz y por ello se transporta H⁺ al medio externo. El gradiente de protones generado puede ser empleado en la síntesis de ATP. Este organismo realiza una fotofosforilación sin clorofila (4).

Cuadro 5.1. Rutas para la fijación de CO₂ por las bacterias autotróficas (6)

Vía reductora del acetil-CoA	fermentadoras homoacetogénicas	<i>Clostridium thermoaceticum</i> <i>Acetobacter woodii</i> <i>Sporomusa</i> sp.
	reductoras del sulfato	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> <i>Desulfovibrio baarsii</i>
	metanogénicas	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> <i>Methanosarcina barkeri</i>
Ciclo inverso del citrato (reductor)	verde del azufre	<i>Chlorobium limicola</i>
	termofilicas del hidrógeno	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>
	reductoras del sulfato	<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>
Ciclo de la ribulosa-difosfato (Calvin)	fototróficas anoxigénicas	<i>Chromatium vinosum</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i>
	quimioautotróficas	nitrificantes oxidantes del azufre bacterias del hidrógeno y el CO oxidantes del hierro
	cianobacterias	

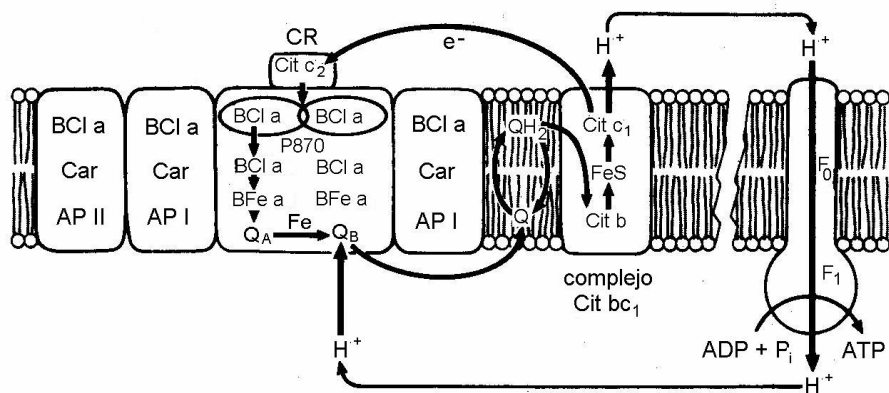


Figura 5.23. Transporte de electrones en la fotosíntesis bacteriana (6)

AP I = antena de pigmentos I (B 870) Car = carotenoides
 AP II = antena de pigmentos II (B 800-850) Cit b = citocromo b
 BCI a = bacterioclorofila a Cit c₁; Cit c₂ = citocromos c₁ y c₂
 BF a = bacteriofitina a Cit bc₁ = complejo de citocromos b y c₁
 Q_A = quinona A FeS = centro sulfuro de hierro
 Q_B = quinona B F₀ y F₁ = componentes de ATP-sintasa
 Q = 'pool' de quinonas
 P 870 = par especial de BCI a
 CR = centro de reacción

En los organismos procarióticos los monómeros para la síntesis de polisacáridos son la uridin-difosfoglucosa o la adenosin-difosfoglucosa. Cuando la célula crece sobre un sustrato que no es glucosa debe

sintetizarla, en un proceso conocido como gluconeogénesis, desde el fosfoenolpiruvato que puede ser obtenido a partir del oxalacetato, un intermediario del ciclo del citrato.

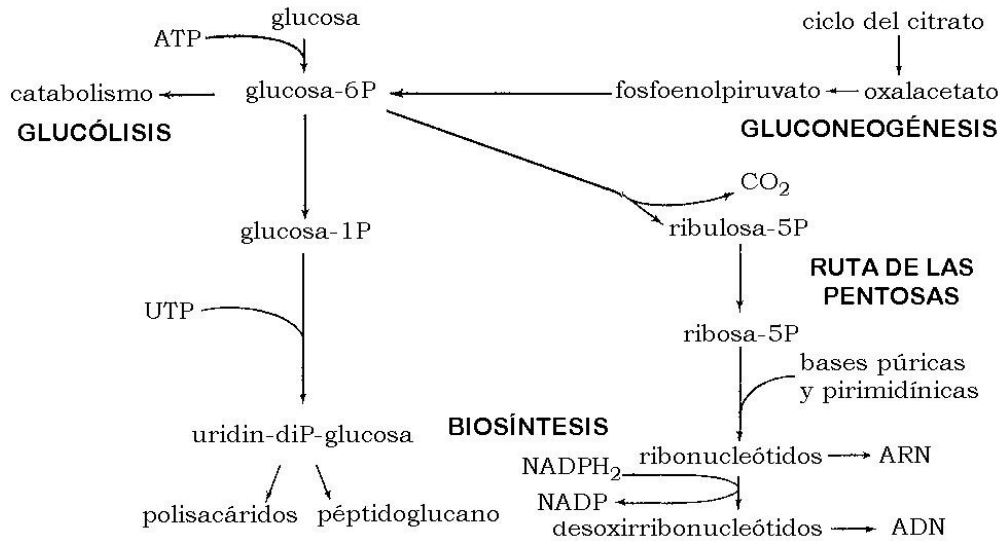
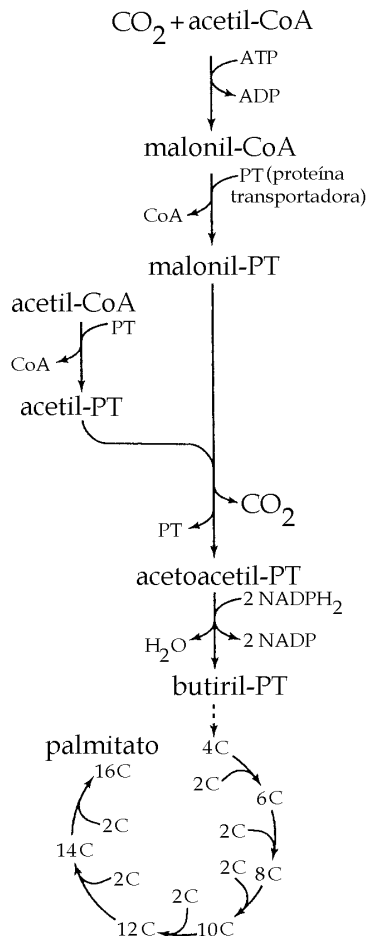


Figura 5.24. Vías para la biosíntesis de glúcidos y nucleótidos (4)



Si las bacterias crecen sobre lactato, piruvato, acetato u otro compuesto, se desarrollan rutas metabólicas adicionales (reacciones anapleróticas) para mantener funcionando el ciclo del citrato y proveer moléculas intermediarias para la síntesis de los azúcares (4).

La trehalosa, un glúcido ampliamente distribuido entre los hongos, se halla disuelto en el citoplasma junto al manitol. Son sintetizados a partir de la glucosa-6-fosfato y de la fructosa, respectivamente (24).

5.7.5. Síntesis de lípidos

Entre los lípidos bacterianos predominan los ácidos grasos saturados o monoinsaturados, son raros los triglicéridos y hopanoides. Estos últimos son moléculas similares a esteroides presentes en micoplasmas y metanotrofos. Los hongos contienen ergosterol, que estabiliza la estructura de la membrana haciéndola menos flexible, y otros esteroides.

La formación de los ácidos grasos de cadena larga comienza con la condensación de los grupos acetilo a malonil-PT (PT: proteína transportadora) para dar butiril-PT y después, se alarga la cadena con dos carbonos en cada paso sucesivo. La etapa final consiste en la adición de los ácidos grasos a la molécula de glicerol (4).

Figura 5.25. Síntesis de un ácido graso (4)

5.7.6. Metabolitos secundarios

Estos compuestos son sintetizados por algunos microorganismos, generalmente en las últimas fases del ciclo de crecimiento y no son requeridos para la biosíntesis celular.

Los más conocidos son los antibióticos y las micotoxinas (ver 6.4.3). No participan en la obtención de energía ni en el crecimiento, sino que contribuyen a la supervivencia al inhibir la acción de los competidores que pudieran ocupar el mismo nicho ecológico (1).

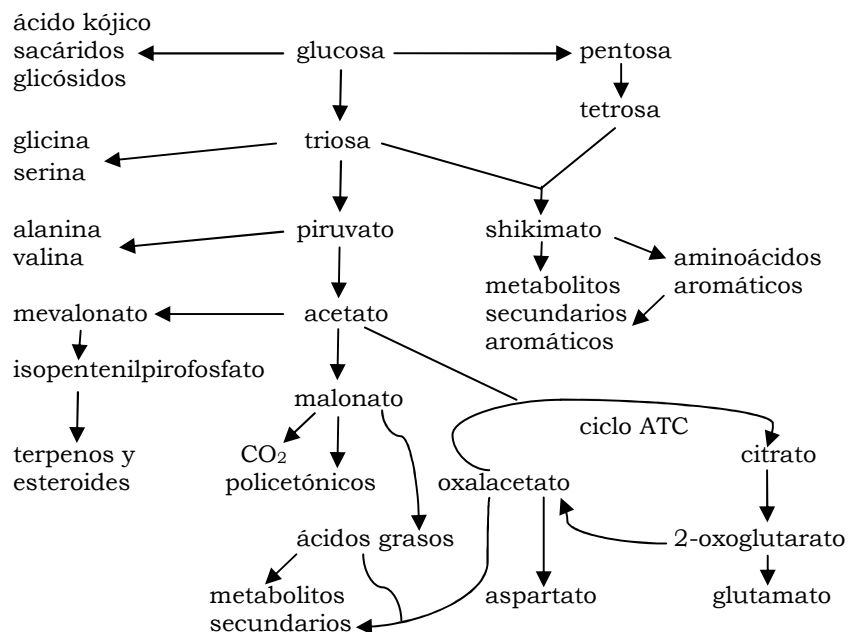


Figura 5.26. Interrelación entre los metabolitos primarios y la síntesis de los secundarios (24)

Referencias

1. Atlas RM, Bartha R. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4° ed. Addison Wesley, Madrid, 2002.
2. Fenchel T *et al.* Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling. 2° ed, Academic Press, San Diego, 2000.
3. Ivanov V. Environmental Microbiology for Engineers. CRC Press, Boca Raton, FL, 2011.
4. Madigan TM *et al.* Brock-Biology of Microorganisms. 10° ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2003.
5. Phaff HJ. Investigación y Ciencia 62: 22, 1981.
6. Schlegel HG, Zaborosch C. General microbiology. Cambridge University Press, UK, 1993.
7. Stanier RY *et al.* Microbiología. 4° ed, Reverté, Barcelona, 1984.
8. Jagnow G, Dawid W. Biotecnología. Acribia, Zaragoza, 1991.
9. Wyman CE, ed. Handbook on Bioethanol. Taylor & Francis, Washington, 1996, pp. 253.
10. Schink B. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61: 262, 1997.
11. Carlile MJ *et al.* The Fungi. 2° ed. Academic Press, San Diego, 2001.
12. Dommergues Y, Mangenot F. Écologie microbienne du sol. Masson et Cie, Paris, 1970.
13. Alef K, Nannipieri P, editores. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, London, 1995.
14. Coyne M. Microbiología del suelo. Paraninfo, Madrid, 2000.
15. Alexander M. Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT Editor, México, 1980.
16. American Water Works Association. Agua, su Calidad y Tratamiento. UTEHA, México, 1968, p. 64
17. Stevenson F.J. Cycles of Soil. John Wiley, New York, 1986.
18. Strasburger E *et al.* Tratado de Botánica. 7° ed. Marín, Barcelona, 1986, p.306
19. Darnell JE. Investigación y Ciencia 111: 36, 1985.
20. Castillo F, Cárdenas J. Investigación y Ciencia 134: 88, 1987.
21. Yurkov VV, Beatty T. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 695, 1998.
22. Fredrickson JK, Onstott TC. Investigación y Ciencia 243: 22, 1996
23. Stevens TO, McKinley JP. Science 270: 450, 1995
24. Moore D *et al.* 21st. Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press, 2011
25. Kavanagh K. Fungi. Biology and Applications. 2° ed. Wiley-Blackwell, 2011.

